ALKAN-BILDUNG ALS PARAMETER EINER LIPIDPEROXIDATION IN RATTENLEBERMIKROSOMEN UND IN VIVO SOWIE IHRE BEEINFLUSSUNG DURCH EISEN-IONEN

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

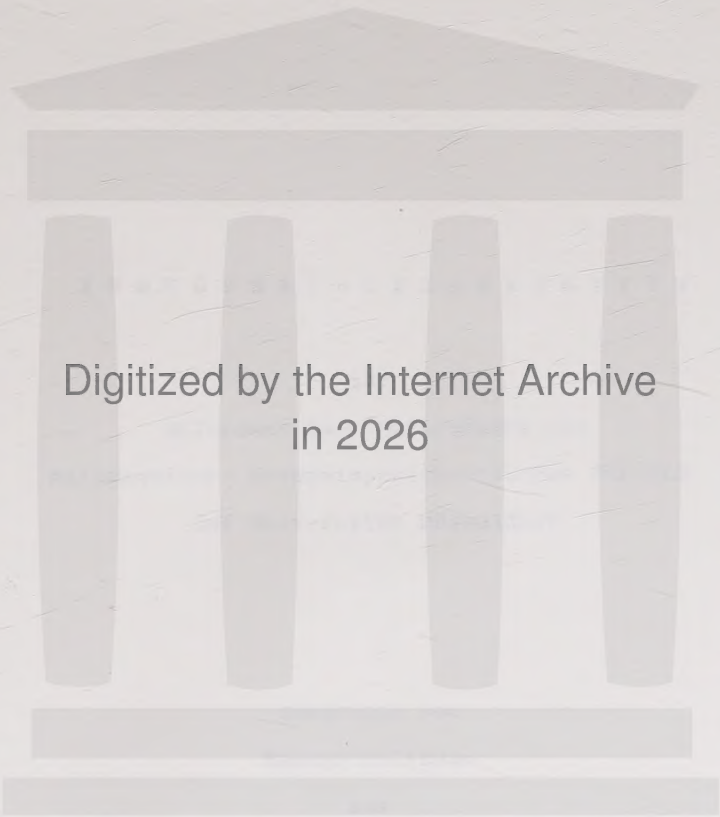
vorgelegt von

Hassan Muliawan

aus

Djakarta, Indonesien

Düsseldorf 1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538105_0010

ALKAN-BILDUNG ALS PARAMETER EINER LIPIDPEROXIDATION IN RATTENLEBERMIKROSOMEN UND IN VIVO SOWIE IHRE BEEINFLUSSUNG DURCH EISEN-IONEN

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hassan Muliawan

aus

Djakarta, Indonesien

Düsseldorf 1981

Tag der mündlichen Prüfung:

Dekan	: Prof. Dr. W. Peters
1. Berichterstatter	: Priv.-Doz. Dr. H. Kappus
2. Berichterstatter	: Prof. Dr. G. Wulff

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1978 bis Oktober 1981 am Medizinischen Institut für Umwelthygiene an der Universität Düsseldorf in der Abteilung für Pharmakologie unter Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Hermann Kappus durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas der Arbeit und für die Betreuung bei ihrer Durchführung sowie für zahlreiche Ratschläge und Anregungen danke ich Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Hermann Kappus.

Für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes danke ich Herrn Prof. Dr. med. H.-W. Schlipköter.

Herrn Diplom-Biochemiker Dr. H. Ottenwälder, Herrn Diplom-Biochemiker Dr. R.M. Schulze und Frau Diplom-Biologin N. de Ruiter danke ich für wertvolle Anregungen und Diskussionen.

Fräulein C. Steinmetz danke ich für das Anfertigen einiger Zeichnungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS SEITE

	Abkürzungen und Strukturformeln	1
1.	Einleitung	4
2.	Material	9
2.1.	Chemikalien und Biochemikalien	9
2.2.	Material für die Gaschromatographie	10
2.3.	Geräte	12
2.4.	Tiere	13
3.	Methoden	14
3.1.	Präparation von Lebermikrosomen	14
3.2.	Proteinbestimmung	14
3.3.	Inkubationssystem für in vitro-Versuche	15
3.4.	Inkubationen mit Lebermikrosomen	17
3.5.	Malondialdehyd-Bestimmung	18
3.6.	System zur Messung von Alkanen im Tierversuch	20
3.7.	In vivo-Versuche	21
3.8.	Gaschromatographische Bestimmung der Kohlenwasserstoffe	23
4.	Ergebnisse	26
4.1.	Kontrolle und Optimierung der verwendeten Systeme	26
4.1.1.	System für in vitro-Versuche	26
4.1.2.	System für in vivo-Versuche	28
4.1.3.	Überprüfung der Herkunft der Kohlenwasserstoffe	33
4.2.	Fe^{2+}-induzierte Lipidperoxidation	37
4.2.1.	In Lebermikrosomen	37
4.2.2.	In vivo-Versuche	43
4.2.3.	Einfluß von (+)-Catechin auf die Fe^{2+}-ausgelöste Lipidperoxidation in vivo	50
4.2.4.	Einfluß von Silybin auf die Fe^{2+}-ausgelöste Lipidperoxidation in vivo	53
4.3.	Versuche mit Bleomycin	59
4.3.1.	In Lebermikrosomen	59
4.3.2.	In vivo-Versuche	68

SEITE

4.4. Versuche mit Adriamycin 74
4.4.1. In Lebermikrosomen 74
4.4.2. In vivo-Versuche 82
4.5. Versuche mit Paraquat in vivo 99
4.6. CCl_4-induzierte Lipidperoxidation 102
4.6.1. In Lebermikrosomen 102
4.6.2. In vivo-Versuche 108
4.6.3. Einfluß von (+)-Catechin auf die durch CCl_4 und Fe^{2+}-Ionen induzierte Ethan-Bildung in vivo 114
4.6.4. Einfluß von Silybin auf die durch CCl_4 und Fe^{2+}-Ionen induzierte Ethan-Bildung in vivo 116

5. Diskussion 118
5.1. Alkane als Parameter für eine Lipidperoxidation 118
5.2. Fe^{2+} als Initiator einer Lipidperoxidation 122
5.3. Bleomycin als Initiator einer Lipidperoxidation 129
5.4. Adriamycin als Initiator einer Lipidperoxidation 133
5.5. Paraquat als Initiator einer Lipidperoxidation 138
5.6. Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) als Initiator einer Lipidperoxidation 142
5.7. Schlußfolgerung 146

6. Zusammenfassung 149

7. Literaturverzeichnis 152

ABKÜRZUNGEN UND STRUKTURFORMELN

ADP : Adenosindiphosphat

ADR : Adriamycin

BLM : Bleomycin

EDTA : Ethylendiamin-tetraessigsäure

FID : Flammenionisationsdetektor

GC : Gaschromatographie

ICDH : Isocitrat-Dehydrogenase

i.p. : intraperitoneal

KG : Körpergewicht

KW : Kohlenwasserstoff

NADP : ß-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat

p.o. : per oral

PTFE : Polytetrafluorethylen

PVC : Polyvinylchlorid

Sdp. : Siedepunkt

SGE : Scientific Glass Engineering

TBS : Thiobarbitursäure

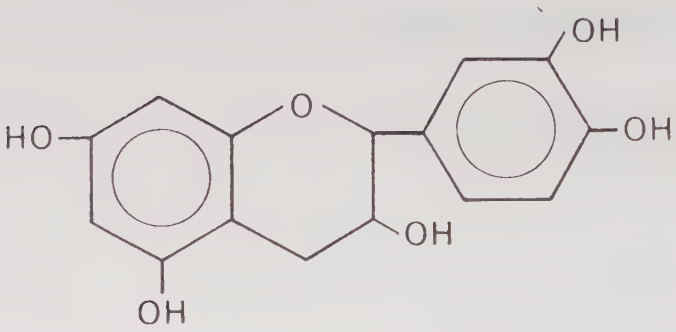
TCA : Trichloressigsäure

Tris : Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

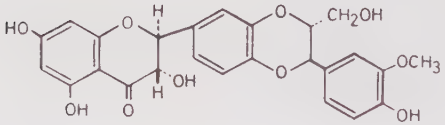
vpb : Volumen pro Billion (1×10^{-9})

vpm : Volumen pro Million (1×10^{-6})

1. (+)-Catechin = (+)-Cyanidanol-3:

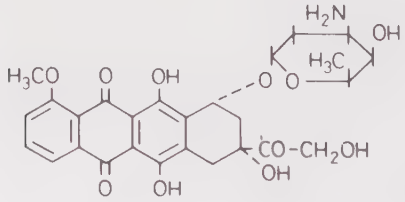


2. Silybin:

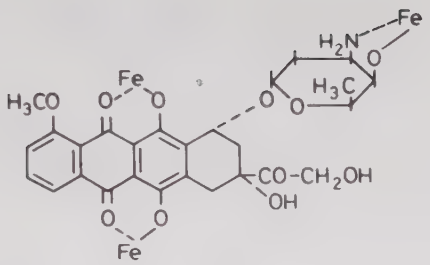


Silybindihemisuccinat-Na_2: Die beiden aliphatischen OH-Gruppen sind mit Bernsteinsäure verestert.

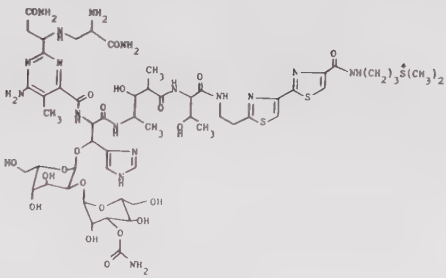
3. Adriamycin:



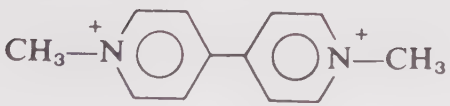
4. Quelamycin:



5. Bleomycin A_2:



6. Paraquat = N,N´-Dimethyl-4,4´-dipyridyldihydrochlorid:



1. EINLEITUNG

Membranbarrieren stellen einen wesentlichen determinierenden Faktor in der Evolution biologischer Systeme dar. Von besonderer Bedeutung sind in dieser Beziehung Zellmembranen und Membranen verschiedener Zellkompartimente, wie z.B. des Zellkerns, der Mitochondrien, der Lysosomen, des Golgi-Apparates und des endoplasmatischen Retikulums. Die Integrität dieser Membranen ist essentiell für das Leben einer Zelle überhaupt. Die meisten biologischen Membranen sind Lipidmembranen mit wechselndem Gehalt mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Ungesättigte Fettsäuren können jedoch in Gegenwart von Sauerstoff relativ leicht autoxidieren, was vor allem in der Lebensmittelchemie eingehend untersucht wurde. Beim Autoxidationsprozeß spielen neben Sauerstoff wahrscheinlich katalytische Mengen von Metall-Ionen eine wichtige Rolle. Man weiß, daß die Autoxidation ungesättigter Fettsäuren als Radikalkettenreaktion abläuft, wobei eine Vielzahl verschiedener Reaktionsprodukte entsteht, u.a. auch Lipidperoxide (1, 2, 3).

Es war lange Zeit umstritten, ob in lebenden Organismen diese sogenannte Lipidperoxidation ebenfalls ablaufen kann. Seit 10 bis 20 Jahren gibt es aber ausreichende Beweise dafür, daß unter bestimmten Bedingungen in pflanzlichen, tierischen und menschlichen Zellen eine Lipidperoxidation ablaufen kann (1, 3, 4). Allerdings sind zum Nachweis einer Lipidperoxidation immer Eingriffe in die Biochemie der jeweiligen Zellen bzw. Organe notwendig, was entweder durch Belastung mit sehr hohen Konzentrationen physiologischer Substanzen, wie z.B. Eisen-Ionen, oder mit unphysiologischen Chemikalien, wie z.B. Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4), gelang.

Die Lipidperoxidation wird während der letzten Jahre vor allem deshalb so intensiv untersucht, weil vermutet wird, daß neben Alterungsprozessen Stoffwechselkrankheiten, u.a. auch Krebs,

beim Menschen mit einer Lipidperoxidation erklärt werden könnten (1, 2, 3). Außerdem haben besonders die Untersuchungen mit CCl_4 die Frage aufgeworfen, ob akute und chronische Vergiftungen durch Chemikalien aus Industrie und Umwelt, oder durch Arzneimittel hervorgerufene Nebenwirkungen, möglicherweise durch eine Lipidperoxidation bedingt sind (1, 3, 5 - 18). Diese Hypothese ist deshalb so attraktiv, weil eine Radikalkettenreaktion wie die Lipidperoxidation biologische Effekte auch kleiner Dosen bzw. Konzentrationen erklären könnte; denn im Verlauf der Kettenreaktion wird eine große Zahl von Membranbestandteilen zerstört.

Allerdings ergaben sich bei der Untersuchung der Lipidperoxidation in biologischen Systemen verschiedene Probleme:

1. Es entstehen zahlreiche, bisher unbekannte Produkte, deren biochemische Wirkungen noch lange nicht erfaßbar sind.
2. Verschiedene Zwischenprodukte sind chemisch ausreichend reaktiv, so daß sie mit anderen biologischen Molekülen, wie z. B. Proteinen, Nukleinsäuren, Stoffwechselprodukten u.a., reagieren (1o)
3. Zusätzlich werden einige der gebildeten Reaktionsprodukte durch Enzyme verstoffwechselt, so daß sie nicht mehr gemessen werden können (1).
4. In biologischen Systemen existieren sehr wirksame Abfangmechanismen, durch die entweder Radikalkettenreaktionen zum Abbruch gebracht werden, oder durch die einmal entstandene Lipidperoxide inaktiviert werden (1, 11, 19).

Diese Schwierigkeiten führten dazu, daß oft sehr widersprüchliche Daten zur Lipidperoxidation veröffentlicht wurden.

Ein Lichtblick existiert jedoch in diesem Zusammenhang seit Riely und Mitarbeiter (6) 1974 zeigen konnten, daß die Messung flüchtiger Alkane, die in der Lebensmittelchemie als Zerfallsprodukte von Lipidperoxiden schon lange bekannt waren (2o-22), auch in biologischen Systemen, wie z.B. in Leberhomogenat und

im Ganztier, möglich ist. Nachgewiesen ist, daß Ethan beim Zerfall von ω3-mehrfach-ungesättigten Fettsäurehydroperoxiden und n-Pentan aus ω6-mehrfach-ungesättigten Fettsäurehydroperoxiden entstehen (23, 24). Einige Autoren, einschließlich Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, in der die vorliegenden Untersuchungen durchgeführt wurden, haben die Methode der Alkan-Bestimmung inzwischen mit Erfolg eingesetzt, um eine Lipidperoxidation in vivo zu messen (5, 8, 9, 14, 15, 25 - 3o). Aufgrund der bisher vorliegenden Befunde herrscht die einhellige Meinung vor, daß die Alkan-Entstehung eine Lipidperoxidation widerspiegelt (1o). Weil nur sehr geringe Mengen von Alkanen entstehen, müssen besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden um auszuschließen, daß Artefakte gemessen werden (5, 1o, 15, 26). Außerdem muß bei allen Versuchen berücksichtigt werden, daß die Alkane nur ein Maß für eine Lipidperoxidation darstellen, mit dem keineswegs der gesamte Prozeß der Lipidperoxidation erfaßt wird; denn nur ein Bruchteil der ungesättigten Fettsäuren zerfällt zu Alkanen (1o). Es scheint jedoch eine gute Korrelation zwischen der Alkan-Entstehung und anderen Parametern der Lipidperoxidation zu bestehen (14, 15).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Frage gestellt, welche Rolle Eisen-Ionen bei der Initiation und Propagation einer enzymatisch katalysierten Lipidperoxidation spielen. Gemessen wurden immer Ethan und häufig auch Propan und n-Pentan. Es ist bekannt, daß Eisen-Ionen eine Lipidperoxidation in isolierten Mikrosomen und Mitochondrien der Leber auslösen können, wobei Enzyme maßgeblich beteiligt sind (31 - 37). Der Mechanismus dieser Eisen-induzierten Lipidperoxidation ist aber noch völlig unklar (2, 35, 38). Es gibt außerdem bisher nur wenige Anhaltspunkte dafür, daß auch im Ganztier eine Lipidperoxidation durch Eisen-Ionen auslösbar ist. Für die "endogene" Lipidperoxidation in vivo gibt es aber wahrscheinlich gar keine andere Möglichkeit.

Besonders interessierte, wie Eisen-Ionen mit O_2 in Wechselwirkung treten und welche Bedeutung O_2-metabolisierende Enzyme bei der Initiation der Lipidperoxidation haben.
Um einer Lösung dieser schwierigen Frage näherzukommen, wurden einige Modellverbindungen verwendet, die in Zellen Sauerstoff aktivieren können. Zum Beispiel reduzieren die Zytostatika Bleomycin und Adriamycin und das Herbizid Paraquat Sauerstoff unter bestimmten Bedingungen zum Superoxid-Radikal ($\cdot O_2^-$) (39 - 46). Superoxid wurde von vielen Autoren für die Initiation der Lipidperoxidation verantwortlich gemacht. Es mußte geklärt werden, ob diese Verbindungen tatsächlich eine Lipidperoxidation in vitro und in vivo auslösen können oder ob nicht zusätzlich Eisen-Ionen benötigt werden, wie dies vor kurzem postuliert wurde (47). Dabei war zu berücksichtigen, daß Adriamycin und Paraquat wahrscheinlich selbst $\cdot O_2^-$ bilden, nachdem sie vorher durch Reduktasen reduziert wurden, während Bleomycin zuerst mit Fe^{2+}-Ionen einen Komplex bilden muß, der ein Elektron auf O_2 überträgt.
Als in vitro-Modell wurden Lebermikrosomen verwendet, da sie neben dem Substrat der Lipidperoxidation, den ungesättigten Fettsäuren, alle Enzyme enthalten, die für die Eisen-induzierte Lipidperoxidation notwendig sind. Außerdem katalysieren mikrosomale Enzyme den Redoxzyklus von Adriamycin und Fe-Bleomycin, wobei Superoxid-Radikale ($\cdot O_2^-$) entstehen.
Die Frage, welche Rolle Eisen-Ionen in vivo bei der Initiation einer Lipidperoxidation spielen, wurde vor allem in Ratten untersucht, da mit dieser Tierspezies bisher die meisten Erfahrungen vorliegen.
Die in vivo-Versuche sind vor allem im Zusammenhang mit der Frage von Bedeutung, ob in biochemischen Modellsystemen gewonnene Ergebnisse auf die Situation in vivo übertragbar sind. Außerdem kann nur bei in vivo-Untersuchungen geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen einer Lipidperoxidation und der beobachteten Toxizität besteht.

Um zu klären, welche Bedeutung den Eisen-Ionen bei der Propagation der Lipidperoxidation bzw. beim Peroxidzerfall zukommt, wurde als Modellverbindung CCl_4 eingesetzt, das wahrscheinlich nach metabolischer Umwandlung zu $\cdot CCl_3$ mehrfach ungesättigte Fettsäuren direkt radikalisch angreift. Hierbei sind freie Eisen-Ionen nicht beteiligt. Deshalb kann die Frage der Beteiligung der Eisen-Ionen bei der Propagation nur in einem solchen Modellfall untersucht werden. Bei den anderen verwendeten Substanzen sind Eisen-Ionen sowohl an der Initiation als auch an der Propagation der Lipidperoxidation beteiligt. Außerdem mußten gerade im CCl_4-Modell die Bedingungen in vitro mit denen in vivo verglichen werden; denn neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß in den Bereichen der Leber, wo die CCl4-Toxizität zuerst manifest wird, völlig andere Bedingungen vorhanden sind, als üblicherweise bei in vitro-Versuchen vorliegen (29).

Auf die Verbesserung bzw. den Neuaufbau von Methoden wurde im Rahmen dieser Arbeit besonderer Wert gelegt. Neben der Optimierung der gaschromatographischen Trennung der Alkane mußte ein System für in vitro-Inkubationen neu entwickelt werden, und zwar auf der Basis des Ausschlusses von Kontaminationen aus der Umgebungsluft und der fehlerfreien Gasprobenentnahme, die gewährleisten mußte, daß die enzymatischen Prozesse im Inkubat nicht beeinflußt wurden. Außerdem mußte geprüft werden, welcher Anteil der Alkane überhaupt gemessen wurde und ob ein Metabolismus der Alkane stattfindet. Auf vorhandene Systeme konnte bei den in vitro-Inkubationen nicht zurückgegriffen werden, da bisher kaum solche in vitro-Versuche durchgeführt worden sind. In vivo mußte bewiesen werden, daß die Alkane wirklich endogen gebildet werden und nicht eine Abatmung vorher gespeicherter Alkane stattfindet. Außerdem mußte das Verhalten der Alkane im System und in den Tieren überprüft werden.

2. MATERIAL

2.1. Chemikalien und Biochemikalien

Sämtliche Laborchemikalien und Biochemikalien wurden in der jeweils reinsten Form verwendet.
Folgende Chemikalien und Biochemikalien wurden bezogen:

Von der Firma Behringwerke AG, Marburg:
- Humanalbumin; reinst

Von der Firma Böhringer, Mannheim:
- NADP-Na_2; 98%
- Isocitratdehydrogenase (ICDH) aus Schweineherz, in 5o% Glycerin gelöst

Von der Firma Merck, Darmstadt:
- Sämtliche Organischen Lösungsmittel; p.a.
- Sämtliche Anorganischen Laborchemikalien; p.a.
- Saccharose; reinst
- Thiobarbitursäure, Reagenz auf Sorbinsäure; 99%
- Trichloressigsäure; p.a.
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; p.a.
- Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz
- Kalium-Natrium-Tartrat; p.a.

Von der Firma Serva, Heidelberg:
- DL-Isocitronensäure, Na_3-Salz.$2H_2O$; 99%, allofrei
- Methylviologen (Paraquat, N,N'Dimethyl-4,4'dipyridyldihydrochlorid); reinst

Von der Firma Zyma GmbH, München:
- (+)-Catechin ((+)-Cyanidanol-3); 96%

Von der Firma Dr. Madaus & Co., Köln:
- Silybin (Silybindihemisuccinat-Na-Salz)

Von der Firma Heinrich Mack, Illertissen:
- Bleomycin (Bleomycinum Mack^R), bestehend aus: Bleomycin A_2 : 55 - 7O%

Bleomycin A_2': < 7%
Bleomycin B_2: 25 - 32%
Bleomycin B_4: < 1%
Andere Bleomycine der B-Gruppe: < 35%
Eine Ampulle enthielt eine standardisierte biologische Aktivität von 15 mg Bleomycin. Alle Versuche wurden so durchgeführt, daß die Bleomycin-Menge auf diese standardisierte biologische Aktivität bezogen war.

Von der Firma Sigma Chemie GmbH, München:
- Desoxyribonucleinsäure (DNS); Typ I, Natrium-Salz, hochpolymere aus Kalbsthymus.

Von der Firma Montedison Pharmaceutica, Freiburg:
- Adriamycin (Doxorubicin.HCl); das verwendete Adriamycin war Adriblastin^R. Eine Ampulle Adriblastin^R enthielt 5o mg Adriamycin (99% rein) und 25o mg Lactose.
- Quelamycin^R (Doxorubicin-Fe^{3+} im Verhältnis 1 : 3). Eine Ampulle enthielt 25 mg Quelamycin, 5oo mg Mannit, 16 mg Tris und 59 mg NaCl.

Eigene Herstellung von Quelamycin:
Adriamycin wurde in H_2O gelöst, dann wurde langsam eine $FeCl_3$-Lösung (in H_2O) zugesetzt. Das molare Verhältnis war:
1 Mol Adriamycin und 3 Mol $FeCl_3.6H_2O$
Die Adriamycin-Fe^{3+}-Lösung wurde mit 1 n NaOH bis pH 4,5 titriert und dann über Millipore-Filter (o,2 µ) filtiert.

2.2. Material für Gaschromatographie

Folgende Materialien wurden bezogen:

Von der Firma Messer Griesheim GmbH, Duisburg:
- Stickstoff 5,o; 99,999 Vol.% ($O_2 \leq 2$ vpm, $H_2O \leq 3$ vpm, KW $\leq$ o,1 vpm, $CO/CO_2 \leq$ o,1 vpm, Ar ≤ 5 vpm)

- Wasserstoff 5,0, 99,999 Vol.% ($O_2 \leq 1$ vpm, $N_2 \leq 5$ vpm, $H_2O \leq 5$ vpm, KW $\leq$ 0,1 vpm, $CO/CO_2 \leq$ 0,1 vpm)
- Synthetische Luft; 20/21 Vol.% O_2 in N_2, KW-frei
- Eichgasmischung mit Analysenzertifikat. Sie enthielt:
  0,65 vpm Ethan
  0,66 vpm Propan
  0,60 vpm n-Pentan
  Der Rest war N_2
- Ethan 3,5; > 99,95 Vol.% ($O_2 \leq$ 10 vpm, $N_2 \leq$ 40 vpm, $H_2O \leq 5$ vpm, KW $\leq$ 400 vpm, $CO_2 \leq$ 100 vpm)
- Sauerstoff 4,5; 99,995 Vol.% ($N_2 \leq$ 20 vpm, $H_2O \leq 5$ vpm, KW $\leq$ 0,5 vpm, $CO_2 \leq$ 0,5 vpm, Ar $\leq$ 10 vpm, Kr/Xe ≤ 5 vpm)
- Alle Gasarmaturen

Von der Firma Linde AG, Höllriegelskreuth:

- Plastigas^R-Beutel (aus Aluminiumfolie)
- n-Butan 2,5: 99,5 Vol.% (i-Butan 0,33 Vol.%, 2,2-Dimethylpropan 0,1 Vol.%, n-Pentan 0,22 Vol.%)
- Ethylen 2,8: 99,8 Vol.% ($C_nH_m \leq$ 1500 vpm, $N_2 \leq$ 100 vpm, $O_2 \leq$ 20 vpm)

Von der Firma Werner Guenther Analysen Technik, Griesheim:

- V4A-nachbehandelte Gaschromatographie-Säulen mit 1/8 Zoll Außendurchmesser und 2 mm Innendurchmesser
- Sämtliche Verbindungsstücke für die Gaschromatographie
- Säulen-Vibrator zum Füllen mit Trennmaterial
- Glaswolle
- PTFE-Dichtband
- S.G.E. Mikroliter-Spritzen Typ A und B
- PTFE-beschichtete Silicon-Gummi-Septen; Größe 12,5 x 3 mm
- n-Pentan, 99%

Von der Firma Hamilton, Bonaduz, Schweiz:

- Mikroliter-Spritzen der 700-Serie und der 800-Serie

Von der Firma Henke-Sass Wolf GmbH, Leibertingen:
- Plastik-Einmalspritzen für die Aufnahme der Gasproben

Von der Firma Perkin-Elmer Bodenseewerk & Co. GmbH, Überlingen:
- Kieselgel JoCe 3o/6o mesh für die Füllung der Trennsäulen

Von der Firma Bayer-Enders, Düsseldorf:
- Glas-Apparaturen und Laborbedarf
- Silicon- und PVC-Schläuche

Von der Firma Kontron Technik GmbH, Eching:
- PTFE-Schläuche mit 3,o mm Außendurchmesser und 1,5 mm Innendurchmesser.

2.3. Geräte

Für Zentrifugationen wurden eine Sorvall-Kühlzentrifuge RC-2 mit Rotor Typ SS-34, eine Beckmann-Ultrazentrifuge L 8-7o mit Rotor Typ 3o sowie eine Eppendorf-Tischzentrifuge 5412 verwendet. Für photometrische Messungen wurde ein Zeiss-Spektralphotometer eingesetzt.
Die Inkubationen in vitro wurden in einem Schüttelwasserbad SW 2o der Firma Gerhardt, Bonn, durchgeführt.
Zur Pipettierung von Flüssigkeiten wurden in der Regel Eppendorf-Mikroliterpipetten Verwendet.
Die gaschromatischen Kohlenwasserstoff-Bestimmungen wurden mit einem Gaschromatographen Modell 572o A der Firma Hewlett-Packardt, Böblingen, durchgeführt. Dieser war mit einem Flammenionisationsdetector (FID) ausgerüstet; dosiert wurde über 2 mit Umschaltventil verbundene 5 ml Gasprobenschleifen. Die Aufzeichnung und Auswertung der Detektorsig-

nale erfolgte mit Hilfe eines Integrators, Modell 338o A der Firma Hewlett-Packardt, Böblingen.

2.4. Tiere

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten von Ivanovas, Kisslegg, verwendet, die bis zum Versuch Wasser und Trockenfutter (Altromin^{R}) ad libidum erhielten. Sie waren in klimatisierten Tierstall-Räumen bei normalem Hell-Dunkel-Rhythmus untergebracht. Das Gewicht der Tiere lag bei Versuchsbeginn zwischen 17o g und 23o g.
Die NMRI und C3H-Mäuse stammten aus dem Zentralinstitut für Versuchstiere, Hannover. Sie erhielten ebenfalls Wasser und Trockenfutter bis zum Versuchsbeginn. Ihr Gewicht betrug 25 - 3o g.

3. METHODEN

3.1. Präparation von Lebermikrosomen

Die Präparationen der Lebermikrosomen erfolgten in Anlehnung an die Methode von Remmer et al. (48). Die Ratten wurden mit CO_2 narkotisiert, dekapitiert, entblutet und die Lebern in 25o mM Saccharose-Lösung aufgenommen. Das restliche Blut in der Leber wurde durch Perfusion mit physiologischer Kochsalzlösung (o,9 %ige NaCl-Lösung) entfernt. Nach Zerkleinerung wurde die Leber in 6,5-fachem Volumen 25o mM Saccharose-Lösung mit einem Potter-Elvejehm-Homogenisator homogenisiert und das Homogenat lo min bei 7ooo g in der Sorvall-Kühlzentrifuge bei O^oC zentrifugiert. Der Überstand wurde 45 min bei 1o5ooo g in der Beckmann-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in KCl-Tris-Puffer (1,15 %ige KCl-Lösung in aqua bidest. und 25o mM Tris.HCl-Puffer, pH 7,4 im Verhältnis 4 : 1) aufgenommen, im Potter-Homogenisator resuspendiert und danach noch einmal 45 min bei 1o5ooo g zentrifugiert. Der so gewaschene Mikrosomenniederschlag wurde in KCl-Tris-Puffer resuspendiert und nach der Bestimmung des Proteingehaltes mit KCl-Tris-Puffer so verdünnt, daß die Mikrosomensuspension lo mg mikrosomales Protein pro ml enthielt.

3.2. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde in Anlehnung an die Methode von Lowry et al. (49) durchgeführt.
Die nach 3.1. gewonnene Mikrosomensuspension wurde mit H_2O 1 : loo verdünnt. Als Standard wurde Humanalbumin (lo mg/ml H_2O) verwendet, der ebenfalls 1 : loo verdünnt war.

o,2 ml der Probe bzw. des Standards wurden mit o,2 ml 1 n NaOH-Lösung und 2,o ml alkalischem Kupferreagenz vermischt, geschüttelt und lo min stehen gelassen. Alkalisches Kupferreagenz wurde unmittelbar vor Verwendung frisch hergestellt. Es bestand aus lo ml 2 %iger $NaCO_3$-Lösung, o,1 ml 2,7 %iger Na^+/K^+-Tartrat-Lösung und o,1 ml 1 %iger $CuSO_4.5H_2O$-Lösung.

Nach lo min wurden o,2 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, das unmittelbar vor der Verwendung 1 : 1 mit aqua bidest. verdünnt worden war, zugegeben, geschüttelt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 3o min wurde die Extinktion bei 72o nm gegen einen gleichermaßen behandelten H_2O-Leerwert gemessen.

3.3. Inkubationssystem für in vitro-Versuche

Die Inkubationen wurden in einer selbst entwickelten Apparatur (Abb. 1) durchgeführt. Die Inkubationsmischung wurde bei 0^oC in den Erlenmeyerkolben (8 in Abb. 1) pipettiert. Danach wurde der Kolben mit der Waschflasche (4 in Abb. 1) über das Glasstück (7 in Abb. 1) verbunden. Zur Entfernung eventueller Gasverunreinigungen wurde der Gasraum über dem Inkubat (im Erlenmeyerkolben) mit KW-freier Synthetischer Luft gespült. Dazu wurde die Luft über dem Inkubat mit Hilfe eines Wasserstrahlvakuums über eine Kanüle (12 in Abb. 1) abgesaugt. Gleichzeitig strömte KW-freie Synthetische Luft vom Vorratsbehälter (im Plastigas^R-Beutel) in den Erlenmeyerkolben über eine Waschflasche (4 in Abb. 1). Der Spülvorgang dauerte ca. 1 min. Während dieser Zeit befand sich der Erlenmeyerkolben mit dem Inkubat im Eiswasserbad. Vor der Inkubation wurde die Verbindung zur Wasserstrahlpumpe entfernt. Die Inkubation selbst wurde dadurch gestartet, daß der Erlenmeyerkolben mit dem Inkubat ins Schüttelwasserbad (Wassertemperatur 37^oC) gebracht wurde.

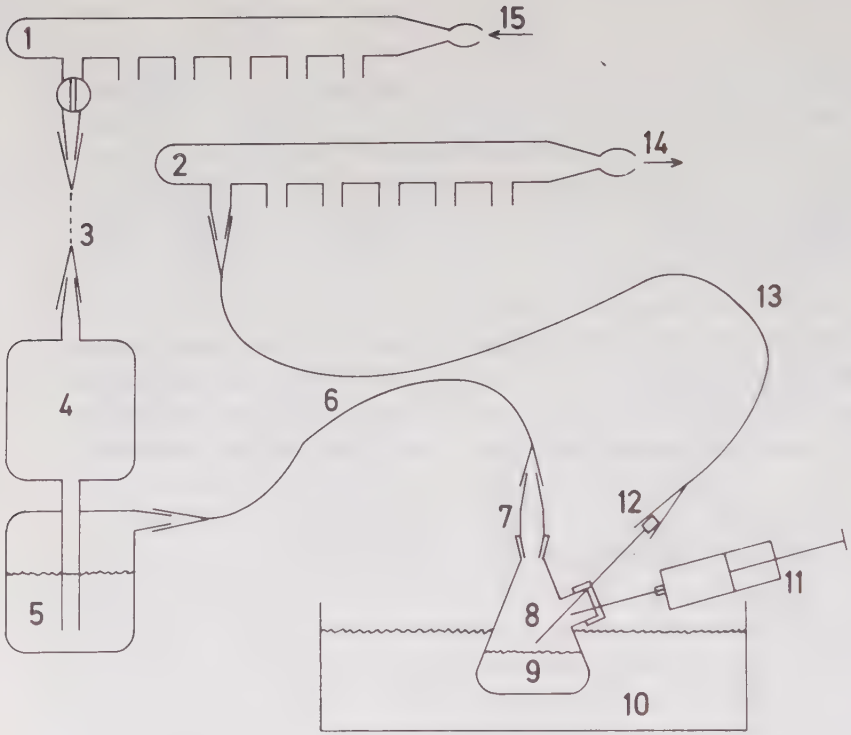


Abb. 1: Schema der Apparatur für in vitro-Versuche

1. Rechen aus Glas mit Schliffhähnen
2. Rechen aus Glas mit Oliven
3. PVC-Schlauch
4. Waschflasche aus Glas für Druckausgleich
5. Destilliertes Wasser
6. PTFE-Schlauch
7. Glas-Stück mit 1 Kernschliff und 1 Olive
8. Erlenmeyerkolben mit Schliff und Seitenarm mit Gewinde und Verschlußkappe mit PTFE-Septum
9. Inkubat
10. Schüttelwasserbad
11. Gasprobenspritze
12. Kanüle
13. PVC-Schlauch
14. Verbindung zur Wasserstrahlpumpe
15. Verbindung zur Synthetischen Luft (Vorrat in Plastigas^{R}-Beutel)

Prooxidantien und Reagenzien für den Start der Reaktion wurden mit Hilfe einer Kanüle und einer Präzisionsspritze durch das PTFE-Septum zugegeben.
Die Gasproben wurden folgendermaßen entnommen: Mittels einer gasdichten Injektionsspritze wurden 8 ml des Gasraumes über dem Inkubat abgezogen. Gleichzeitig strömten 8 ml KW-freie Synthetische Luft aus dem Vorratsbehälter über die Waschflasche (4 in Abb. 1) nach. Um eine gleichmäßige Verteilung in der Probenspritze, im Inkubationsgefäß und im Gasraum oberhalb der Sperrflüssigkeit (5 in Abb. 1) zu erhalten, wurde die Gasprobe in der Gasspritze 2- bis 3-mal hin- und hergepumpt. Danach wurde die Probenspritze mit der Gasprobe bis zur Analyse mit einem gasdichten Verschluß versehen. Maximal 3 Stunden nach Entnahme der Gasprobe wurde die gaschromatographische Analyse durchgeführt (s. 3.8.).
Für die Malondialdehyd-Bestimmung wurden Proben aus dem Inkubat mit Hilfe einer langen Kanüle, die durch das PTFE-Septum gesteckt wurde, entnommen. Die Probe wurde dann mit TCA-Lösung versetzt und anschließend, wie unter 3.5. beschrieben, aufgearbeitet.

3.4. Inkubationen mit Lebermikrosomen

Der 5 ml Standard-Inkubationsansatz enthielt:

- 3,o ml KCl-Tris-Puffer, pH 7,4 (1,15 %ige KCl-Lösung, 25o mM Tris.HCl-Puffer im Verhältnis 4 : 1)
- o,75 ml 53,3 mM Na-Isocitrat-Lösung
- o,o25 ml Isocitrat-Dehydrogenase-Lösung (lo mg ICDH/ml Glycerin)
- o,5 ml Mikrosomensuspension (lo mg mikrosomales Protein/ml).

Gestartet wurden die Inkubationen nach 5 min Vorinkubation bei 37°C durch Zugabe von:

o,75 ml 6,7 mM NADP-Lösung bzw. Puffer-Lösung und den jeweils zu untersuchenden Substanz-Lösungen (max. o,o5o ml/ 5 ml Inkubat)

Die Endkonzentrationen im Inkubat betrugen daher:

8,oo mM Na-Isocitrat
o,o5 mg ICDH/ml Inkubat
1,oo mg mikrosomales Protein/ml Inkubat
1,oo mM NADP-Na_2

Na-Isocitrat-, ICDH- und NADP-Lösung dienten als NADPH-regenerierendes System.

Die Mikrosomensuspension wurde bei $0^{o}C$ ins Inkubationsgefäß pipettiert, das dann an die Apparatur angeschlossen und mit Synthetischer Luft gespült wurde (s. 3.3.).

Die Zugabe von NADP-Lösung und den jeweils zu untersuchenden Substanzen erfolgte mit Hilfe von Glasspritzen durch das Teflonseptum (s. 3.3.). Zur Bestimmung der Kohlenwasserstoffe wurden zu verschiedenen Zeiten 8 ml-Proben aus dem Gasraum des Inkubationsgefäßes entnommen und gaschromatographisch analysiert. Zur Bestimmung des Malondialdehyds wurden o,2 ml-Proben aus dem Inkubat entnommen und mit o,4 ml 15 %iger TCA-Lösung versetzt.

3.5. Malondialdehyd-Bestimmung

Malondialdehyd ist ein Folgeprodukt des Zerfalls von polyungesättigten Fettsäure-Peroxiden. Er reagiert mit Thiobarbitursäure zu einem Farbstoff, der ein Absorptionsmaximum von 535 nm hat (1, 2, 31, 32, 5o - 53).

Die Bestimmung erfolgte in Anlehnung an die Methode von Smuckler et al. (54), modifiziert nach Kappus et al. (55).

Zur Enteiweißung wurden o,2 ml Probe mit o,4 ml eiskalter 15 %iger TCA-Lösung versetzt. Das gefällte Protein wurde

nach 3o min mit der Eppendorf-Tischzentrifuge 2 min lang abzentrifugiert.
o,5 ml des Überstandes wurden zu o,25 ml 1 %iger Thiobarbitursäure (TBS) zugegeben, gut geschüttelt und in geschlossenen Eppendorf-Gefäßen lo min bei 95°C im Eppendorf-Thermostat erhitzt. Nach Abkühlen wurde die Extinktion bei 535 nm gegen einen gleich behandelten Leerwert gemessen.
Anhand einer linearen Eichkurve, die mit einer Verdünnungsreihe von Malondialdehyd-dimethyl-acetal nach demselben Verfahren erhalten wurde, erfolgte die Konzentrationsbestimmung des Malondialdehyds.

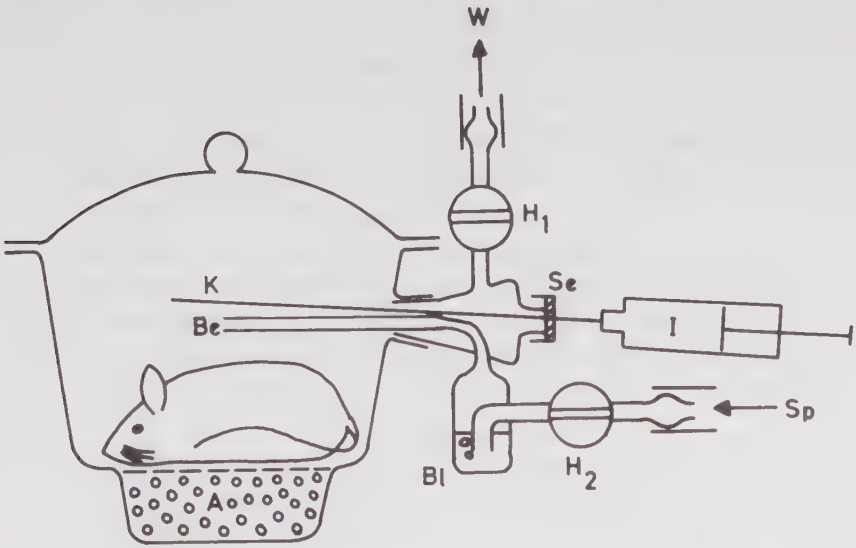


Abb. 2: Schema der Glasapparatur für in vivo-Versuche

A : Atemkalk
Be : Belüftungsrohr (O_2-Zufuhr)
K : Kanüle
Bl : Waschflasche mit Blasenzähler
H_1,H_2: Hähne
Sp : Verbindung zum Spirometer (gefüllt mit O_2)
I : Gasprobenspritze
Se : Verschraubbare Verschlußkappe mit Septum (Teflon)
W : Verbindung zur Wasserstrahlpumpe

3.6. System zur Messung von Alkanen im Tierversuch

In Anlehnung an die Arbeit von Köster et al. (5, 25) wurden die Tiere in gasdichte Apparaturen gesetzt, die aus Glas bestanden, und die zum ersten Mal von Bolt et al. (56) verwendet wurden. Dieses System besteht aus einem Exsikkator mit Deckel und seitlichem Schliff, einem seitlichen Ansatz mit Waschflasche, die H_2O als Sperrflüssigkeit enthält, einer Öffnung mit Gewinde und Verschlußkappe mit Teflonseptum und Hähnen (Abb. 2).
Der Verbindungshahn zur Waschflasche war mit einem 6 l-Spirometer, das mit reinstem Sauerstoff (99,999 Vol.%) gefüllt war, verbunden (Sp in Abb. 2).
Die Größe der Exsikkatoren war so gewählt, daß die Tiere sich darin relativ frei bewegen konnten (Leer-Inhalt ca.1 l).

Nach der Behandlung der Tiere wurden sie in den Exsikkator gesetzt. Um eventuell vorhandene Reste von Alkanen aus der Laborluft zu entfernen, wurde der Exsikkator entweder mit reinem O_2 oder mit Kohlenwasserstoff-freier Synthetischer Luft gespült. Im unteren Teil des Exsikkators befand sich Atemkalk. In dem Maße, in dem die Tiere O_2 verbrauchten und CO_2 abatmeten, das vom Atemkalk gebunden wurde, wurde reiner Sauerstoff aus dem Spirometer über die Waschflasche nachgeführt.
Die 8 ml-Gasproben wurden aus dem Gasraum des Exsikkators mit Hilfe einer langen Kanüle und einer gasdichten Probenspritze durch das Teflonseptum hindurch abgezogen. Gleichzeitig strömten 8 ml Sauerstoff aus dem Spirometer über die Waschflasche in den Exsikkator. Um eine gleichmäßige Gasverteilung in dem System zu erhalten, wurde die Gasprobe 2- bis 3-mal hin- und hergepumpt. Danach wurden die Gasproben gaschromatographisch analysiert und quantitativ bestimmt (s. 3.8.).

3.7. In vivo-Versuche

Die Tiere, die für in vivo-Versuche eingesetzt wurden, erhielten bis zum Versuchsbeginn normales Futter und Wasser.
Um die biologische Streuung möglichst gering zu halten, wurden die Tiere eine Woche vor dem Versuch angeliefert. Außerdem wurden nur männliche Tiere gleicher Größe und gleichen Gewichts verwendet. Bei den Ratten lag das Gewicht je nach Versuch zwischen 17o g und 23o g, während die Mäuse zwischen 25 g und 3o g wogen.

Behandlung der Tiere mit $FeCl_2$:
Festes $FeCl_2.4H_2O$ wurde immer in trockener N_2-Atmosphäre aufbewahrt. Kurz vor Versuchsbeginn wurde $FeCl_2.4H_2O$ abgewogen und in physiologischer Kochsalzlösung (o,9 %ige NaCl in H_2O) gelöst. Danach wurden die Tiere mit dieser Lösung intraperitoneal (i.p.) gespritzt (zwischen o,4 ml und o,8 ml). Die Dosierung erfolgte nach dem Gewicht der Tiere mit Hilfe von 1 ml Einmalspritzen und Einmalkanülen der Größe 12.

Behandlung der Tiere mit Bleomycin:
Das Bleomycinum Mack^R-Präparat wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst (jeweils gesamter Inhalt einer Ampulle) und mit Hilfe einer Einmalspritze und einer Einmalkanüle (Größe 12) den Ratten i.p. appliziert (zwischen o,4 ml und 1,o ml).

Behandlung der Tiere mit Adriamycin:
Das Adriblastin^R-Präparat wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst (jeweils gesamter Inhalt einer Ampulle) und mit Hilfe einer Einmalspritze und einer Einmalkanüle den Ratten i.p. appliziert (zwischen o,4 ml und 1,o ml).

Behandlung der Tiere mit Quelamycin:
Das Quelamycin-Präparat wurde in destilliertem Wasser gelöst (jeweils gesamter Inhalt einer Ampulle) und mit Hilfe einer

Einmalspritze und einer Einmalkanüle den Ratten i.p. appliziert (zwischen o,4 ml und 1,o ml).
Die Behandlung der Tiere mit dem Quelamycin, das selbst hergestellt worden war, erfolgte mit der filtrierten Adriamycin-Fe^{3+}-Lösung, die wie oben i.p. gespritzt wurde.

Behandlung der Tiere mit Paraquat:
Paraquat wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und mit Hilfe einer Einmalspritze und einer Einmalkanüle den Tieren i.p. appliziert (für die Ratten zwischen o,7 ml und 1,5 ml, für die Mäuse zwischen o,5 ml und 1,o ml).

Behandlung der Tiere mit CCl_4:
CCl_4 wurde den Tieren direkt mit Hilfe einer Mikrolitherspritze i.p. appliziert (zwischen o,o5 ml und o,o7 ml).

Behandlung der Tiere mit Silybin:
Silybin-dihemisuccinat-Na-Salz wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und mit Hilfe einer Einmalspritze und einer Einmalkanüle den Ratten i.p. appliziert (zwischen o,5 ml und 1,o ml).

Behandlung der Tiere mit (+)-Catechin:
(+)-Catechin ((+)-Cyanidanol-3) wurde in Borat-Puffer gelöst. Die Zusammensetzung des Borat-Puffers war: Eine H_3BO_3-Lösung wurde mit 1 n NaOH bis pH lo,7 titriert, danach wurde die Lösung mit H_2O so verdünnt, daß die Mischung einer 3,1 %igen H_3BO_3-Lösung entsprach.
(+)-Catechin (gelöst in Borat-Puffer) wurde den Ratten 1 Stunde vor Versuchsbeginn per oral (p.o.) mit Hilfe einer Einmalspritze und einer Schlundsonde verabreicht (zwischen o,5 ml und o,7 ml).

3.8. Gaschromatographische Bestimmung der Kohlenwasserstoffe

Die niedrigsiedenden Alkane, die als vielversprechende Parameter zur Messung der Lipidperoxidation bezeichnet wurden (1, 2, 53), sind in der Literatur zum ersten Mal von Lieberman et al. (2o , 21) und Riely et al. (6) beschrieben worden.
Die quantitative Bestimmung der hier gemessenen Alkane, Ethan, Propan und n-Pentan, wurde in Anlehnung an Köster et al. (5, 25) durchgeführt und wie bereits früher beschrieben (57) modifiziert.
Die Eichung der einzelnen Kohlenwasserstoffe erfolgte mit einem Eichgasgemisch, das o,65 vpm Ethan, o,66 vpm Propan und o,6o vpm n-Pentan in Stickstoff enthielt.
Die 8 ml Gasproben wurden über eine 5 ml Dosierschleife auf die Trennsäule aufgebracht. Als Trennsäule diente eine 5 m lange V4A-Stahlsäule (1/8 Zoll Außendurchmesser, 2 mm Innendurchmesser), die mit Kieselgel JoCe 3o/6o mesh gepackt war.

Reinster Stickstoff (99,999 Vol.%) diente als Trägergas.
Der Stickstoff-Vordruck war 5 bar, die Durchflußgeschwindigkeit (gemessen an der Detektordüse) war 5o ml pro min bei Zimmertemperatur.
Für die Flamme des FID's wurde reinster Wasserstoff (99,999 Vol.%) und Kohlenwasserstoff-freie Synthetische Luft verwendet. Der Vordruck des Wasserstoffs war 1,3 bar, die Durchflußgeschwindigkeit betrug 4o ml pro min. Der Vordruck der Synthetischen Luft war 1,3 bar, die Durchflußgeschwindigkeit betrug 2oo ml pro min.
Die Ofen-Temperatur war 8o^{o}C, wenn isotherm gefahren wurde. Dies geschah, wenn nur Ethan bestimmt wurde.
Um gleichzeitig Ethan, Propan und n-Pentan zu bestimmen, wurde mit einem linearen Temperaturprogramm gearbeitet. In diesem

Fall betrug die Ofen-Anfangstemperatur 90°C. 3 min nach Probenaufnahme wurde sie mit linearem Temperaturprogramm bis 200°C erhöht.
Die Heizrate betrug 12°C pro Minute.
Für die quantitative Bestimmung von Alkanen bei den in vitro-Versuchen wurde folgende Umrechnung gemacht (als Beispiel die Umrechnung von Ethan):

$$\frac{\text{Peakflächen-Einheiten der Probe}}{\text{Peakflächen-Einheiten des Prüfgases}} \times \frac{\text{Volumen des Gasraumes} + 8}{8}$$

x o,1352 x o,2 = X [nmol Ethan/mg mikrosomales Protein]

8 = Aus der Inkubationsapparatur abgenommenes Probenvolumen in ml
o,1352 = Umrechnungsfaktor in nmol Ethan auf 20°C berechnet
o,2 = Umrechnungsfaktor in (mg mikrosomales Protein)$^{-1}$

Da während des Versuchs in bestimmten Zeitabständen Gasproben aus dem Gasraum des Inkubationsgefäßes entnommen wurden, mußte die Verdünnung des Gases in dem System (Gasraum im Inkubationsgefäß und Gasraum oberhalb der Sperrflüssigkeit der Waschflasche, Abb. 1) bei den folgenden Ergebnissen mit berücksichtigt werden.
Die Korrekturberechnungen wurden wie folgt durchgeführt:

Die 1. Gasprobe ergab nach Multiplikation mit dem oberen Faktor den Wert a in nmol Ethan/mg mikrosomales Protein
Die 2. Gasprobe ergab den Wert b in nmol Ethan/mg mikrosomales Protein
Die 3. Gasprobe ergab den Wert c in nmol Ethan/mg mikrosomales Protein.

Der Wert b ist das unkorrigierte Ergebnis der 2. Probe, da bei der Entnahme von Probe 1 das Gasvolumen mit 8 ml KW-freier Synthetischer Luft verdünnt wurde. Um dies zu berücksichtigen, wurde zunächst das während des Zeitraumes zwischen der 1. und 2. Probenentnahme gebildete Gas (Ethan) berechnet.
Es gilt somit:

$$b - \left(\frac{\text{Volumen des Gasraumes}}{\text{Volumen des Gasraumes} + 8} \times a \right) = k$$

Die tatsächliche Ethanmenge der 2. Probe ist:

$$a + k = 1 \quad [\text{nmol Ethan/mg mikrosomales Protein}]$$

Die Korrektur der 3. Probe muß wie folgt durchgeführt werden:
Das zwischen der 2. und 3. Probenentnahme gebildete Gas (Ethan) beträgt:

$$c - \left(\frac{\text{Volumen des Gasraumes}}{\text{Volumen des Gasraumes} + 8} \times b \right) = m$$

Die korrigierte Menge der 3. Probe ist somit:

$$1 + m = n \quad [\text{nmol Ethan/mg mikrosomales Protein}]$$

Bei den weiteren Korrekturen wurden dieselben Umrechnungen wie bei der 3. Probenentnahme durchgeführt.
Für die quantitative Bestimmung von Ethan bei den in vivo-Versuchen wurde eine ähnliche Umrechnung gemacht:
Der Faktor ist:

$$\frac{\text{Peakflächen-Einheiten der Probe}}{\text{Peakflächen-Einheiten des Prüfgases}} \times \frac{\text{Volumen des Gasraumes} + 8}{8}$$

$$\times\ 0{,}1352 \times \frac{1000}{\text{Rattengewicht in g}} = X' \quad [\text{nmol Ethan/kg KG}]$$

Die anderen Korrekturen erfolgten genau so wie bei den in vitro-Versuchen beschrieben.

4. ERGEBNISSE

4.1. Kontrolle und Optimierung der verwendeten Systeme

4.1.1. System für in vitro-Versuche

Als Hauptparameter der Lipidperoxidation wurden in dieser Arbeit die gasförmigen Kohlenwasserstoffe Ethan, Propan und n-Pentan gewählt. Wegen der Flüchtigkeit dieser Alkane mußten entsprechende Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden und Apparaturen entwickelt werden, die zuverlässige und reproduzierbare Messungen gewährleisten (s. 3.3. und 3.6.). Voraussetzung war ein sehr gut arbeitender Gaschromatograph, mit sehr hoher Empfindlichkeit (die Nachweisgrenze für Ethan war kleiner als 1o vpb in einer 5 ml Gasprobe). Wie bei "Methoden" bereits beschrieben, war die Säule mit Kieselgel gepackt (s. 3.8.). Diese Adsorptionschromatographie hat in diesem Fall den Vorteil, daß sie unempfindlich gegenüber Sauerstoff ist, selbst bei hohen Temperaturen. Andererseits ist dieses Säulenmaterial sehr leicht von den Verunreinigungen zu befreien, indem man 1o bis 24 Stunden lang bei 2oo^{o}C ausheizt. Dies gewährleistete ebenfalls die notwendige hohe Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit.

Für die in vitro-Versuche wurde ein System neu entwickelt, das Untersuchungen im geschlossenen System bei normalem Druck ermöglichte (s. 3.3.). Um die Zuverlässigkeit dieses Systems zu prüfen, wurden folgende Versuche durchgeführt: In die Gasphase des Inkubationsgefäßes, das Inkubationsmedium enthielt, wurden kleine Mengen von Ethan bzw. n-Pentan gegeben. Zur homogenen Verteilung der Gase wurde mit Hilfe der Probenspritze hin- und hergepumpt (ca. 3o sec lang), und anschließend eine Gasprobe abgenommen, die gaschromatographisch analysiert wurde.

Auf diese Weise wurde die quantitative Menge von Ethan und n-Pentan, die zugegeben worden war, bestimmt (O-min-Werte).

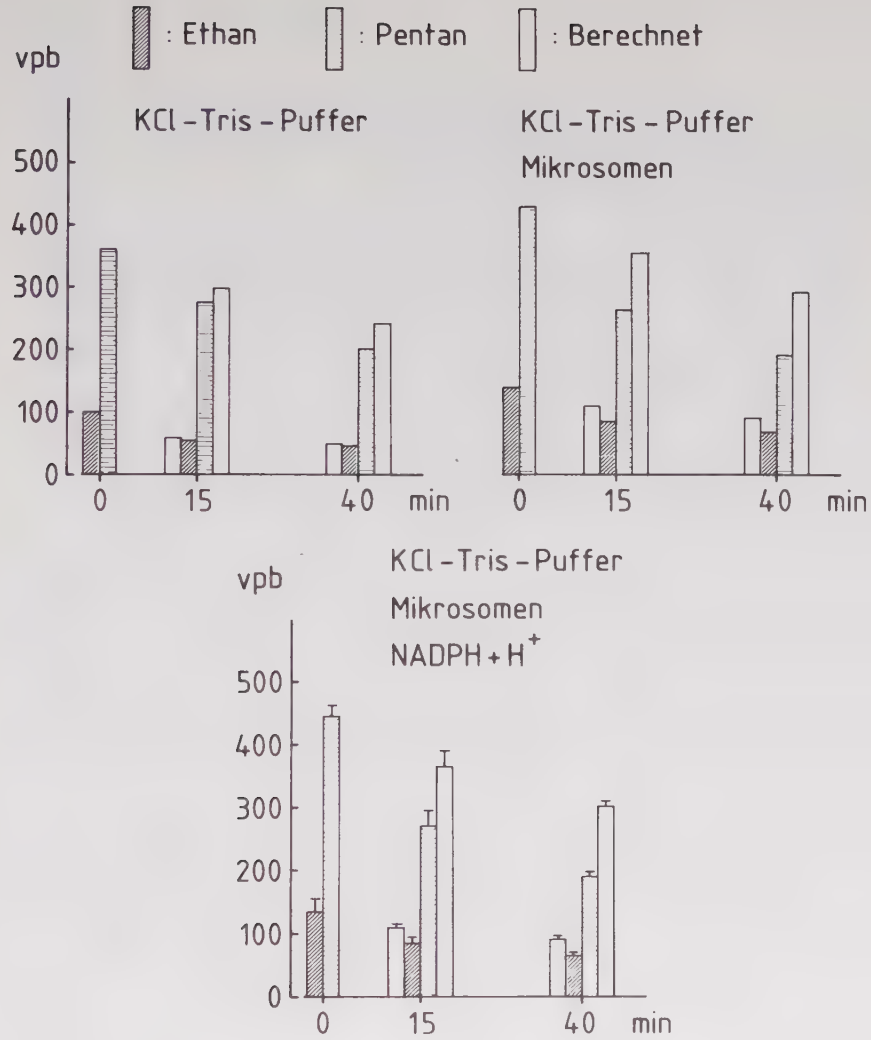


Abb. 3: Überprüfung der Apparatur für die in vitro-Versuche. Die Abbildung zeigt die Menge von zugesetztem Ethan und n-Pentan in der Gasphase während Inkubationen bei 37°C. Die Abnahme der berechneten Werte (offene Säulen jeweils links und rechts der Ethan- bzw. n-Pentan-Werte) ist bedingt durch die Probenentnahmen. Die Werte im oberen Teil stammen aus Doppelwerten, die im unteren aus 3 verschiedenen Experimenten (Mittelwerte $\pm$ s_x)

Nach 15 und 4o min Inkubation bei 37°C wurden nochmals Proben abgenommen und gaschromatographisch analysiert. Die Abbildung 3 zeigt die Ergebnisse.
Bei der Inkubation mit KCl-Tris-Puffer ergaben sich für Ethan praktisch keine Unterschiede zwischen berechneten und gemessenen Werten, während die n-Pentan-Werte niedriger gemessen wurden als nach der Berechnung zu erwarten war. Dies hängt sehr wahrscheinlich mit den physikalischen Eigenschaften des n-Pentan zusammen (Sdp. 36,1°C).
Dieser Versuch zeigt, daß die Inkubationsapparatur die gestellten Anforderungen erfüllt. Sie ist gasdicht und adsorbiert praktisch kein Ethan und nur geringfügig n-Pentan.
Bei den Inkubationen mit Mikrosomensuspensionen ergab sich eine Abnahme sowohl beim Ethan als auch beim n-Pentan. Es zeigte sich, daß die Adsorption von Ethan und n-Pentan durch die Mikrosomen, die hauptsächlich aus Lipidmembranen bestehen, begünstigt war.
Die Abnahme von Ethan und n-Pentan bei den Inkubationen mit KCl-Tris-Puffer und Mikrosomensuspension ist vergleichbar mit der Abnahme bei den Inkubationen, die das NADPH-regenerierende System enthielten.
Aus diesen Versuchen geht eindeutig hervor, daß Ethan und n-Pentan unter diesen Bedingungen nicht NADPH-abhängig metabolisiert werden. Wenn eine Metabolisierung stattfinden würde, müßte die Abnahme bei Inkubationen, die das NADPH-regenerierende System enthalten, größer sein.

4.1.2. System für in vivo-Versuche

Die in vivo-Versuche wurden in Spezialglas-Apparaturen durchgeführt (s. 3.6.). Die Zuverlässigkeit dieses Systems wurde durch folgende Versuche überprüft: Eine kleine Menge

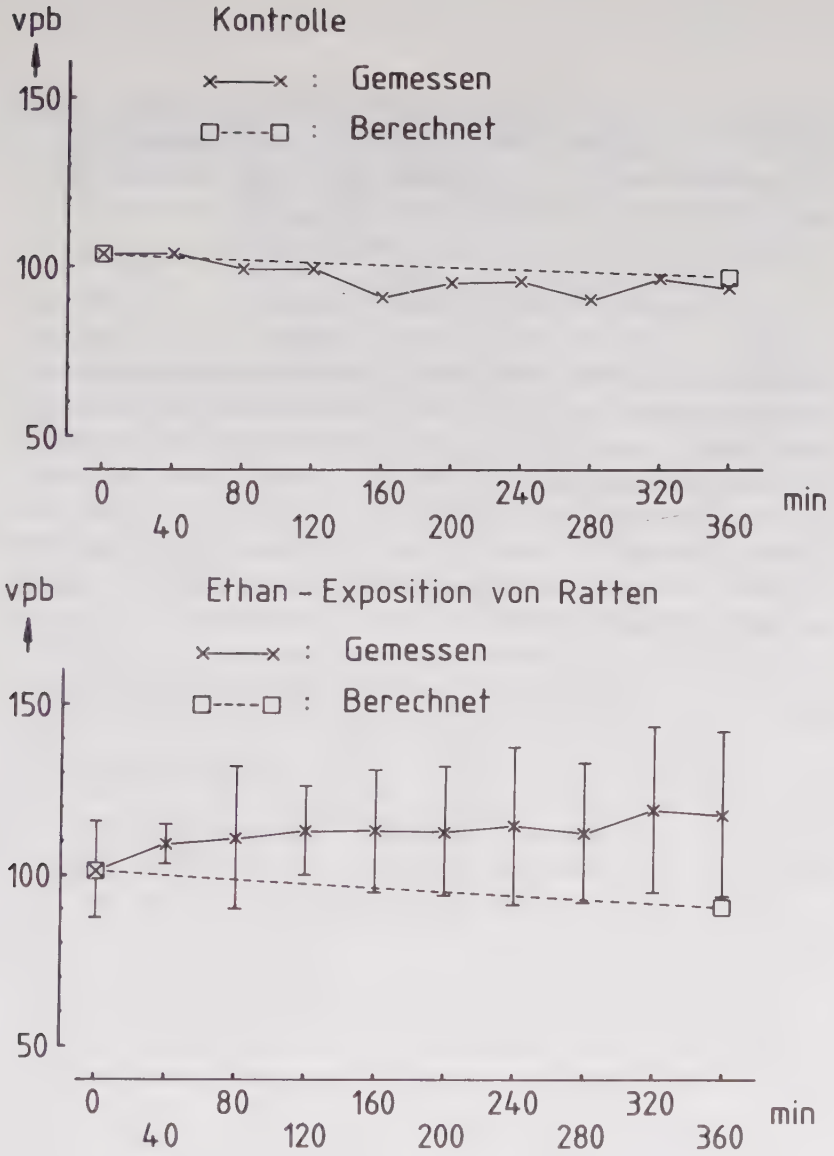


Abb. 4: Überprüfung der Apparatur für die in vivo-Versuche. Bei der Kontrolle wurde Ethan nur in die Apparatur gegeben, ohne Tiere. Die Punkte stammen aus Doppelwerten. Bei der Exposition von Ratten mit Ethan entspricht jeder Meßpunkt dem Mittelwert $\pm s_x$ aus 5 Versuchen.
Der Abfall der berechneten Kurve ist bedingt durch die Probenentnahmen

Ethan wurde in die Apparatur gegeben und die Gasphase durchgemischt (ca. o,5 min lang), indem mit der Probenspritze hin- und hergepumpt wurde. Danach wurde eine Gasprobe entnommen und der Ethan-Gehalt gaschromatographisch bestimmt. Die Abbildung 4, S. 29, zeigt die Ergebnisse.

Beim Kontrollversuch wurde die Dichtigkeit des Systems und die mögliche Adsorption des Ethans an die Glaswand und den verwendeten Atemkalk untersucht. Die kontinuierlich bestimmten Ethan-Mengen waren praktisch identisch mit den berechneten Werten. Wenn jedoch Ratten in der Apparatur saßen, wurde eine Zunahme der Ethan-Werte gegenüber den berechneten Werten während der gesamten Zeit beobachtet. Diese Erhöhung der Ethan-Werte kommt durch die Ethan-Abatmung der Ratten zustande. Diese erhöhten Ethan-Mengen (Abb. 4) sind sehr gut vergleichbar mit denen, die bei den üblichen Versuchen mit Kontrolltieren erhalten werden (Abb. 5).

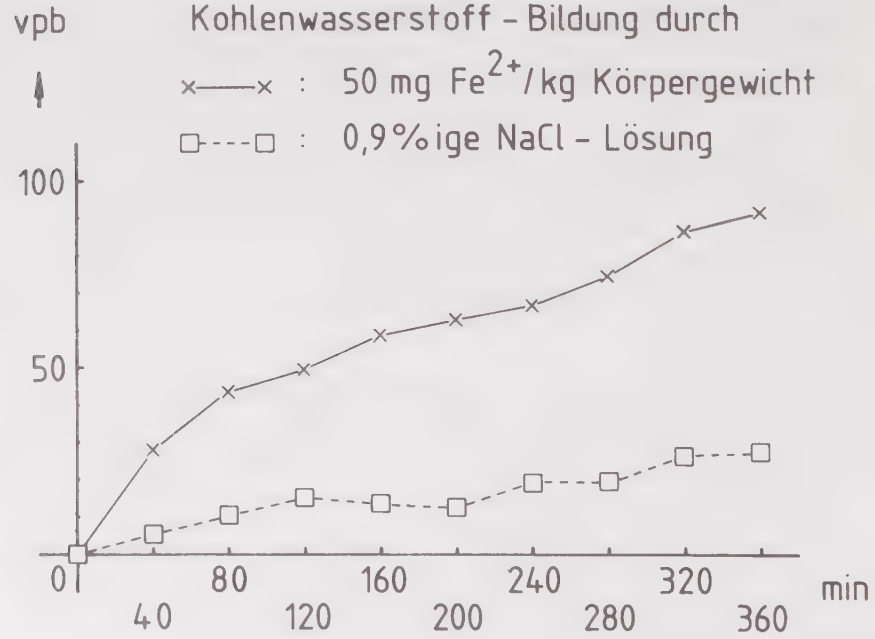


Abb. 5

Abb. 5: Zeitkurve der Ethan-Abatmung von Ratten und Anreicherung des Ethans im Gasraum der Apparatur.

x———x : Eine Ratte im System, die vorher mit 5o mg Fe^{2+}-Ionen pro kg Körpergewicht behandelt worden war.

□----□ : Eine Ratte im System, die vorher mit o,9 %-iger NaCl-Lösung behandelt worden war (Kontrolltier).

Abbildung 5 zeigt außerdem zum Vergleich, wieviel Ethan eine Ratte nach intraperitonealer Behandlung mit $FeCl_2$-Lösung abatmete und wie sich dieses im System mit der Zeit anreicherte.

Um das Verhalten von Ethan und n-Pentan bei den in vivo-Versuchen zu untersuchen, wurden Versuche mit Ethan und n-Pentan durchgeführt. In die Apparaturen wurden kleine Mengen von Ethan und n-Pentan gegeben, die Gasphase mit der Probenspritze durchgemischt und die Gasprobe gaschromatographisch analysiert. Die erste quantitative Analyse entspricht dem O-min-Wert. Nach 2oo min wurde noch einmal eine Gasprobe abgenommen und quantitativ bestimmt.

Das Ergebnis zeigt Abbildung 6. Bei der Kontrolle wurde wieder nur das Adsorptions- und Diffusionsverhalten von Ethan und n-Pentan untersucht. In diesem Versuch befand sich keine Ratte in der Apparatur. Das Ergebnis nach 2oo min zeigt, daß die Ethanwerte sich nicht änderten, wenn man mit den berechneten Werten vergleicht, während der n-Pentan-Wert geringfügig im Vergleich zum berechneten Wert abnahm. Der Grund für die geringe Abnahme von n-Pentan im System liegt wahrscheinlich an den physikalischen Eigenschaften von n-Pentan, wie oben angeführt (s. 4.1.1.).

Die Ergebnisse zeigten deshalb, daß die Adsorption von n-Pentan im Unterschied zu Ethan unter den gewählten Versuchsbedingungen ins Gewicht fallen könnte.

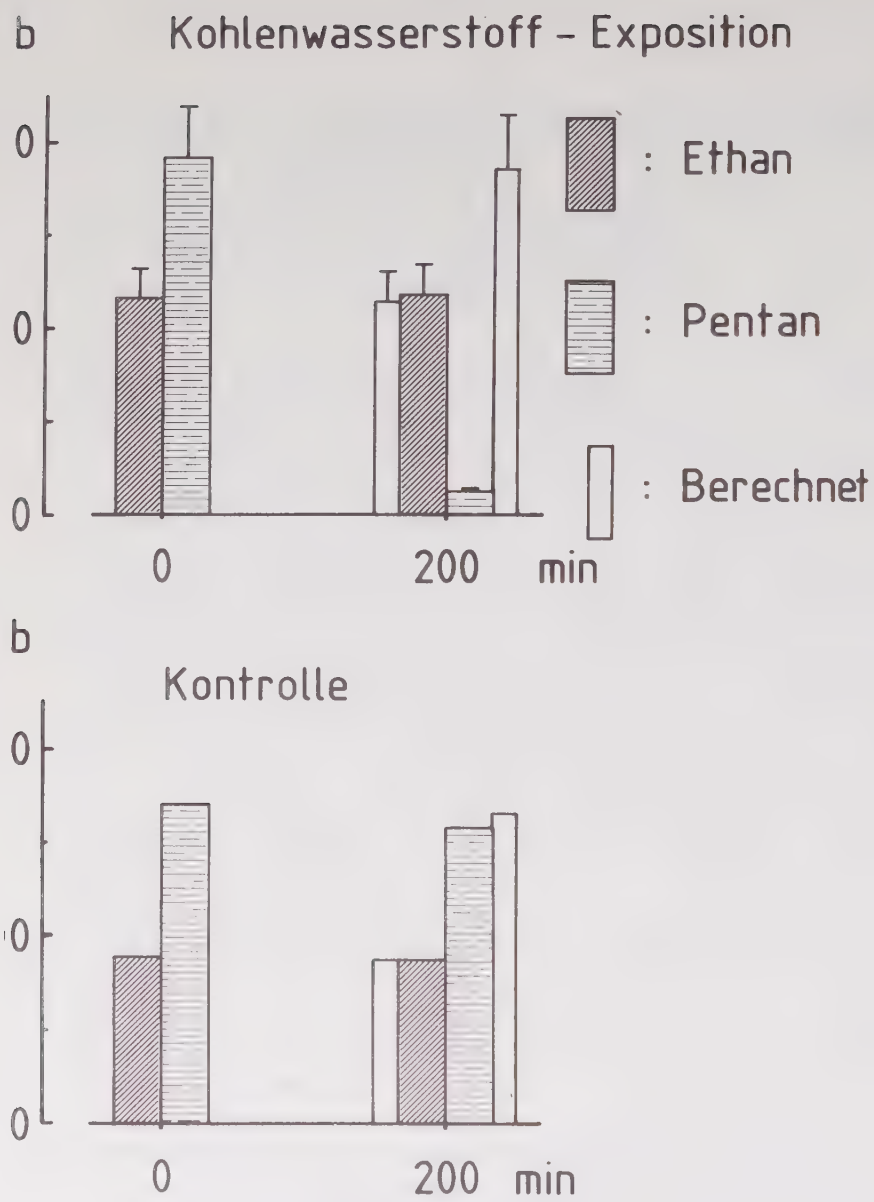


Abb. 6: Überprüfung der Apparatur für die in vivo-Versuche.
Oben: Exposition von Ratten (n=5) mit Ethan und n-Pentan (Mittelwerte + s_x)
Unten: Als Kontrolle diente dieselbe Apparatur, aber ohne Ratte.
Links und rechts der Ethan- bzw. n-Pentan-Werte (2oo min) sind jeweils die berechneten Werte (offene Säulen) dargestellt.

Viel bedeutsamer dürfte aber das Verschwinden von n-Pentan in den Versuchstieren sein: Wie Abbildung 6 oben zeigt, bleibt das zugesetzte Ethan zwar erhalten bzw. nimmt aufgrund von Neubildung noch etwas zu; dagegen nimmt das n-Pentan in Gegenwart einer Ratte ganz erheblich ab (um ca. 8o - 9o %). Möglicherweise sind dafür sowohl Verteilungsphänomene im Organismus als auch eine Metabolisierung von n-Pentan verantwortlich.

4.1.3. Überprüfung der Herkunft der Kohlenwasserstoffe

Da die Tiere für den in vivo-Versuch in der Regel 1 bis 2 Stunden vor dem Versuch in Laborluft gehalten wurden, bestand theoretisch die Möglichkeit, daß sich Ethan der Luft (Laborluft enthielt lo bis 4o vpm Ethan, je nach Wetterlage) im Körper der Tiere anreicherte. Da diese Tiere während des Versuchs in Apparaturen saßen, die mit sehr reinem Sauerstoff oder mit Kohlenwasserstoff-freier Synthetischer Luft gefüllt worden waren, wäre es durchaus möglich, daß sie das im Körper angereicherte Ethan in die Apparatur abatmen.
Um diese Frage zu klären, wurden folgende Versuche durchgeführt: Die Tiere wurden 24 Stunden lang in einen geschlossenen Käfig gesetzt, der mit Kohlenwasserstoff-freier Synthetischer Luft gefüllt worden war. Die Synthetische Luft wurde kontinuierlich erneuert, indem man an einer Öffnung Kohlenwasserstoff-freie Synthetische Luft aus einer Stahlflasche unter mäßigem Druck einleitete, die an der anderen Seite wieder entweichen konnte. Nach 24 Stunden wurden die Tiere sofort in die Apparaturen (Abb. 2) gesetzt, danach wurden kontinuierliche Gasproben abgenommen und gaschromatographisch analysiert. Zum Vergleich wurden parallele Versuche durchgeführt, bei denen die Tiere 24 Stunden lang im Labor gestanden hatten, und die anschließend ebenfalls in die Apparaturen gesetzt wurden.

In Abbildung 7 sind die Ergebnisse dargestellt. Es zeigte sich, daß zwischen diesen beiden Gruppen von Tieren keine signifikanten Unterschiede der Ethan-Bildung beobachtet werden konnten.

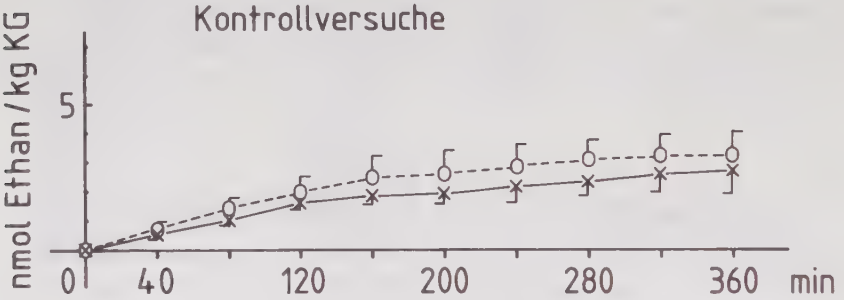


Abb. 7: Ethan-Bildung von Ratten in der in vivo-Apparatur.

x——x : Die Ratten (n=3) atmeten 24 Stunden lang KW-freie Synthetische Luft.

o---o : Die Ratten (n=3) atmeten 24 Stunden lang Laborluft.

Mittelwerte $\pm s_x$

Da die Tiere bei den in vivo-Versuchen in der Regel mit o,9 %iger NaCl-Lösung behandelt wurden, stellte sich die Frage, welchen Einfluß o,9 %ige NaCl-Lösung auf eine mögliche Ethan-Anreicherung im Körper der Tiere hat. Die Tiere wurden wie oben beschrieben nach Behandlung mit o,9 %iger NaCl-Lösung und 24 Stunden Exposition gegenüber Kohlenwasserstoff-freier Synthetischer Luft oder Laborluft in die Apparaturen gesetzt.

Die Ergebnisse zeigen (Abb. 8), dass die Tiere, die 24 Stunden Laborluft geatmet hatten, etwas mehr Ethan abatmeten, als die, die Synthetischer Luft ausgesetzt waren. Der Unterschied ist aber statistisch nicht signifikant.

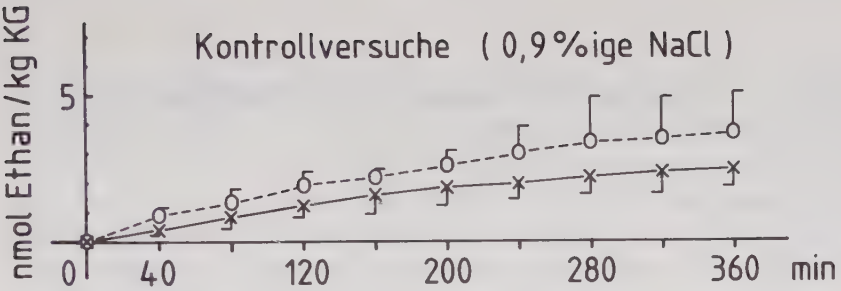


Abb. 8: Ethan-Bildung von Ratten in der in vivo-Apparatur unmittelbar nach Behandlung mit 1 ml o,9 %iger NaCl-Lösung i.p..

x——x : Die Tiere (n=4) atmeten vor der Behandlung 24 Stunden lang KW-freie Synthetische Luft.

o----o : Die Tiere (n=4) atmeten vor der Behandlung 24 Stunden lang Laborluft.

Mittelwerte $\pm$ s_x

Um weitere mögliche Fehler auszuschließen, wurde ein Vergleich bei den mit Fe^{2+}-Ionen behandelten Tieren durchgeführt. Diese wurden 24 Stunden lang entweder Kohlenwasserstoff-freier Synthetischer Luft oder der Laborluft ausgesetzt. Danach wurden diese Tiere mit $FeCl_2$-Lösung behandelt und in die Apparaturen gesetzt.

$FeCl_2.4H_2O$ wurde kurz vor Versuchsbeginn in physiologischer Kochsalz-Lösung (o,9 %ige NaCl-Lösung) gelöst und i.p. gespritzt.

Die Ergebnisse zeigt Abbildung 9. Sie zeigt deutlich, daß kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen bei der Ethan-Bildung auftritt.

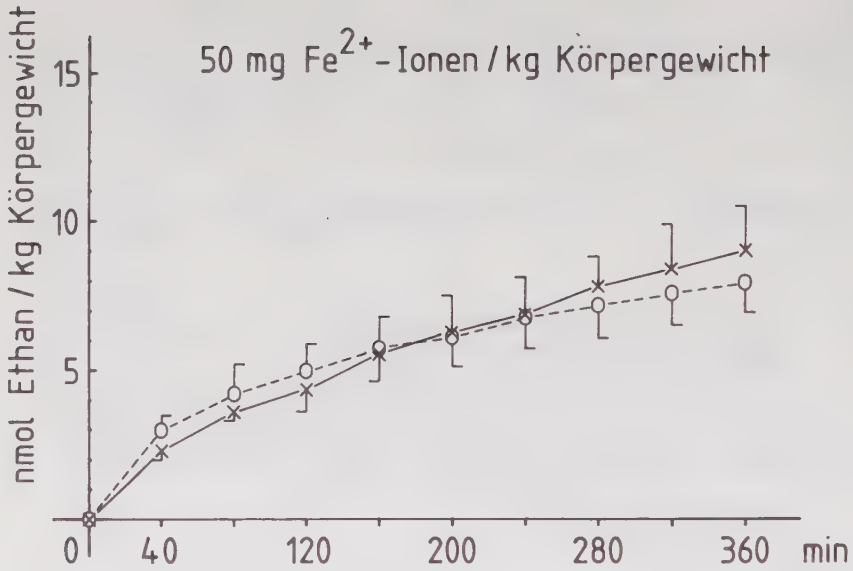


Abb. 9: Ethan-Bildung von Ratten in der in vivo-Apparatur unmittelbar nach Behandlung mit 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p..

x——x : Die Ratten (n=4) atmeten vor der Behandlung 24 Stunden lang KW-freie Synthetische Luft.

o----o : Die Ratten (n=4) atmeten vor der Behandlung 24 Stunden lang Laborluft.

Mittelwerte $\pm$ s_x

Die vorliegenden Versuche zur Überprüfung der Herkunft der Kohlenwasserstoffe zeigen eindeutig, daß ihr Auftreten nicht mit einer einfachen Rückverteilung aus dem Körper der Tiere in die Kohlenwasserstoff-freie Atmosphäre des Systems erklärt werden kann. Es kann auch nicht angenommen werden, daß durch Streß oder dergleichen, der durch die

intraperitoneale Injektion der Stoffe ausgelöst werden könnte, bereits im Körper der Tiere vorhandene Kohlenwasserstoffe aus möglichen "Depots" (z.B. aus dem Fettgewebe) freigesetzt werden. Man kann vielmehr davon ausgehen, daß die Kohlenwasserstoffabatmung der Tiere durch biochemische Prozesse zustande kommt, die in bestimmten Zellen bestimmter Organe immer ablaufen und die durch Behandlung der Tiere mit verschiedenen Substanzen wesentlich verstärkt werden können. Nach den vorliegenden Erfahrungen kommen als biologische Ausgangsmoleküle nur die mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Frage, aus denen bei einer Lipidperoxidation gesättigte Alkane entstehen können (6, 2o, 21, 23, 24, 26, 58 - 6o).

4.2. Fe^{2+}-induzierte Lipidperoxidation

4.2.1. In Lebermikrosomen

Da die NADPH-abhängige mikrosomale Lipidperoxidation durch Fe^{2+}-Ionen seit langem bekannt ist, wurde dieses biologische System verwendet. Im Gegensatz zu dem sonst üblichen Parameter Malondialdehyd (s. 3.5.) wurden die kurzkettigen Alkane, Ethan, Propan und n-Pentan als Parameter gewählt, da nur sie auch im Ganztier gut und reproduzierbar nachweisbar sind (s. Abb. 4 bis 9). Malondialdehyd wurde gelegentlich zur Kontrolle der Versuche mituntersucht. Die Zahlenwerte werden aber nicht angegeben, da sie weitgehend mit denen der neueren Arbeit von Schulze (7) übereinstimmten.
$FeCl_2$ wurde als Prooxidans gewählt. Im Inkubationsmedium mit pH 7,4 mußte jedoch mit einer $Fe(OH)_2$-Ausfällung gerechnet werden, da der pK_1 von $Fe(OH)_2$ 13.5 ist, woraus sich bei pH 7,4 eine freie Konzentration von 31,62 µM errechnet. Die höchste Endkonzentration von Fe^{2+}-Ionen wurde deshalb auf 24 µM festgelegt.

Die Inkubationen wurden in einer speziellen Apparatur durchgeführt (s. 3.3. und 3.4.). Das Volumen jedes Inkubates betrug 5 ml und die Gasphase über dem Inkubat war 37 ml. Die Inkubationen enthielten je 1 mg mikrosomales Protein/ml und jede Inkubation dauerte 15 min. Abbildung lo - 13 zeigen den zeitlichen Verlauf der Ethan-, Propan- und n-Pentan-Bildung während der Inkubation in Abhängigkeit von der Fe^{2+}-Ionen-Konzentration. Die Alkan-Bildung nahm mit der Inkubationszeit und mit zunehmender Fe^{2+}-Konzentration zu.
Die Zeitkurve erreichte bei höheren Konzentrationen ein Plateau nach ca. 12 min, während die Fe^{2+}-Konzentrationskurve ein Optimum bei ca. 12 µM $FeCl_2$ zeigte. Die Abbildungen lo - 13 zeigen eine sehr gute Übereinstimmung der Meßparameter Ethan, Propan und n-Pentan, sowohl in bezug auf den zeitlichen Verlauf, als auch in bezug auf die Konzentrationsabhängigkeit. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, daß das Verhältnis von Ethan : Propan : n-Pentan im Optimumsbereich immer etwa konstant 1 : o,o3 : 2 beträgt, was ganz entscheidend ist für die Frage nach der Verwendbarkeit der einzelnen Meßgrößen als Parameter einer Lipidperoxidation.

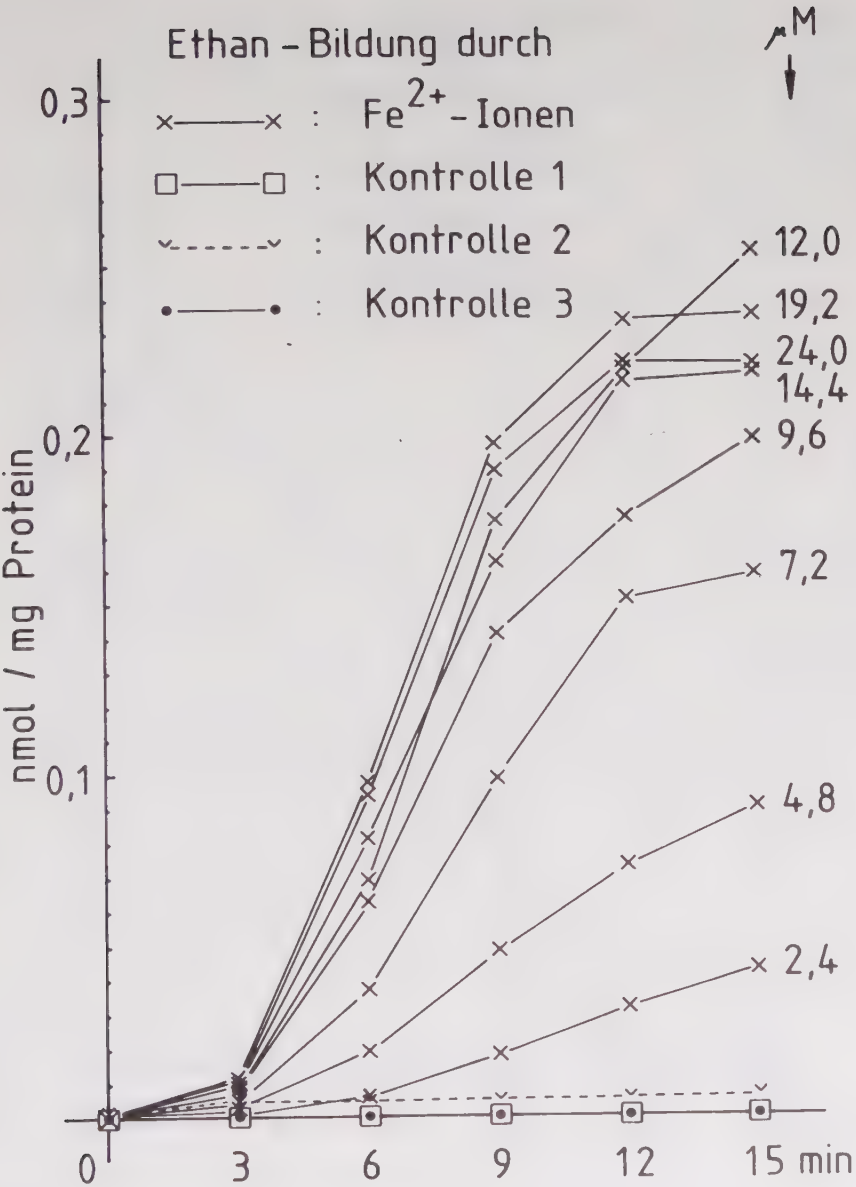
Abb. lo, ll, l2:

Durch Fe^{2+}-Ionen ausgelöste Ethan-, Propan- und n-Pentan-Bildung in Lebermikrosomen (1 mg Protein/ml), die mit einem NADPH-regenerierenden System inkubiert wurden. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von 3 Versuchen.

Kontrolle 1: Inkubationen der Mikrosomensuspension (1 mg Protein/ml) mit NADPH-regenerierendem System aber ohne Fe^{2+} (n=2).

Kontrolle 2: Inkubationen der Mikrosomensuspension (1 mg Protein/ml) mit Fe^{2+}-Ionen, aber ohne NADPH-regenerierendes System (n=2).

Kontrolle 3: Inkubationen der Mikrosomensuspension (1 mg Protein/ml) ohne Fe^{2+}-Ionen und ohne NADPH-regenerierendes System (n=2).


Ethan - Bildung durch
M
× —— × : Fe2+ - Ionen
□ —— □ : Kontrolle 1
v ------ v : Kontrolle 2
• —— • : Kontrolle 3
nmol / mg Protein
0,3
0,2
0,1
0
3
6
9
12
15 min
12,0
19,2
24,0
14,4
9,6
7,2
4,8
2,4

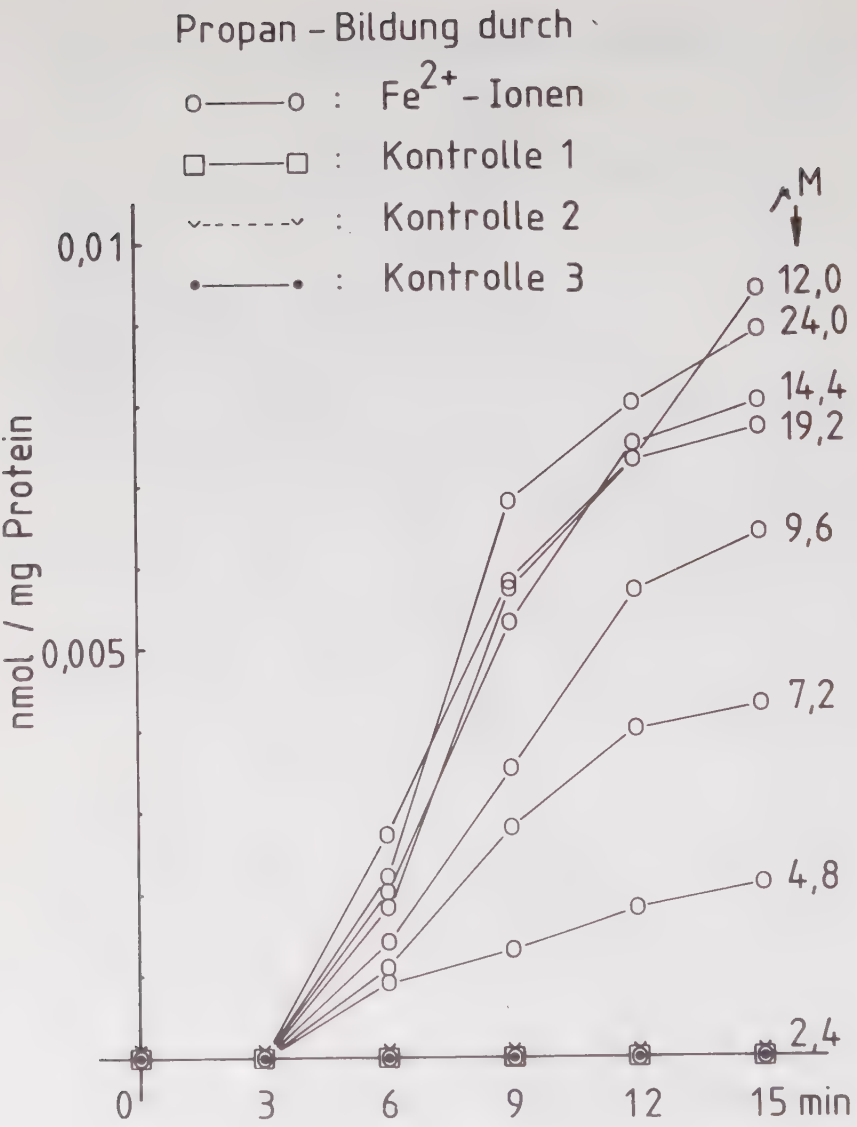

Propan - Bildung durch
o——o : Fe2+ - Ionen
□——□ : Kontrolle 1
v------v : Kontrolle 2
•——• : Kontrolle 3
M
12,0
24,0
14,4
19,2
9,6
7,2
4,8
2,4
0,01
0,005
nmol / mg Protein
0
3
6
9
12
15 min

Abb. 11

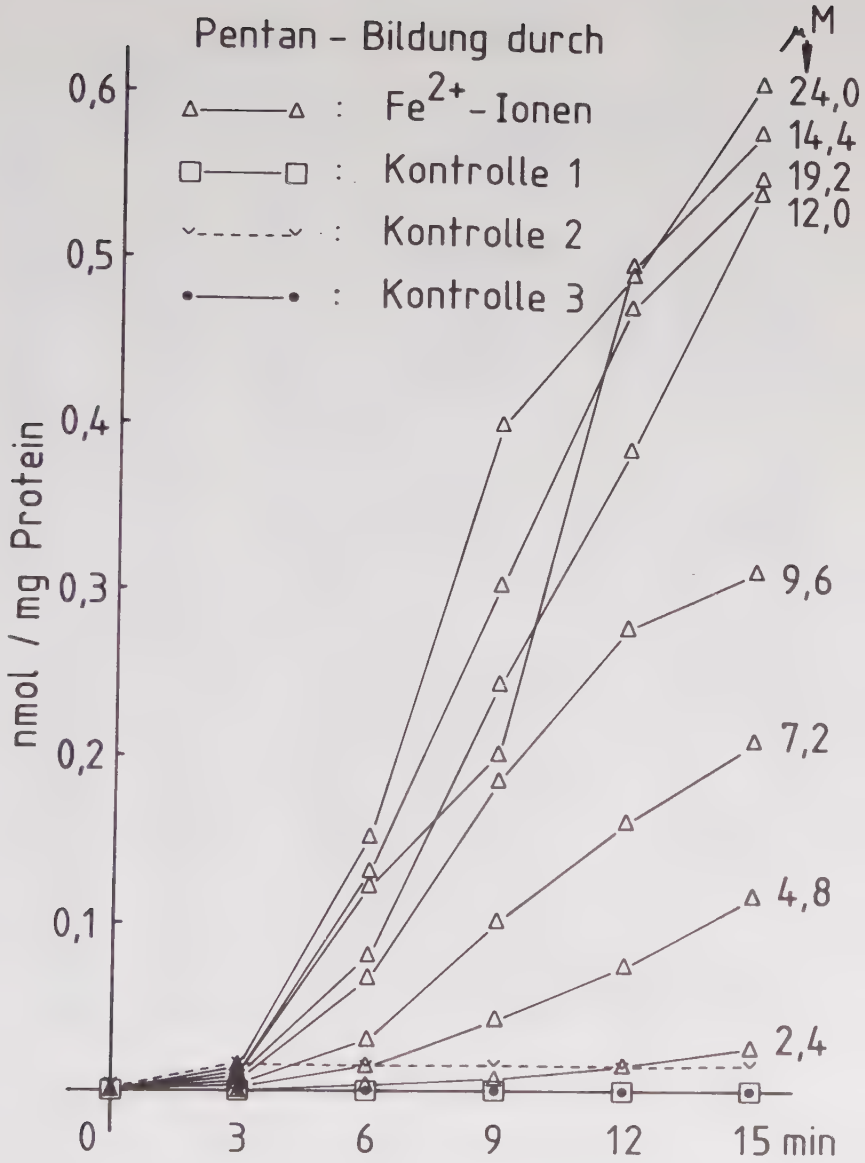

Pentan - Bildung durch
Fe2+ - Ionen
Kontrolle 1
Kontrolle 2
Kontrolle 3
M
24,0
14,4
19,2
12,0
9,6
7,2
4,8
2,4
nmol / mg Protein
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
3
6
9
12
15 min

Abb. 12

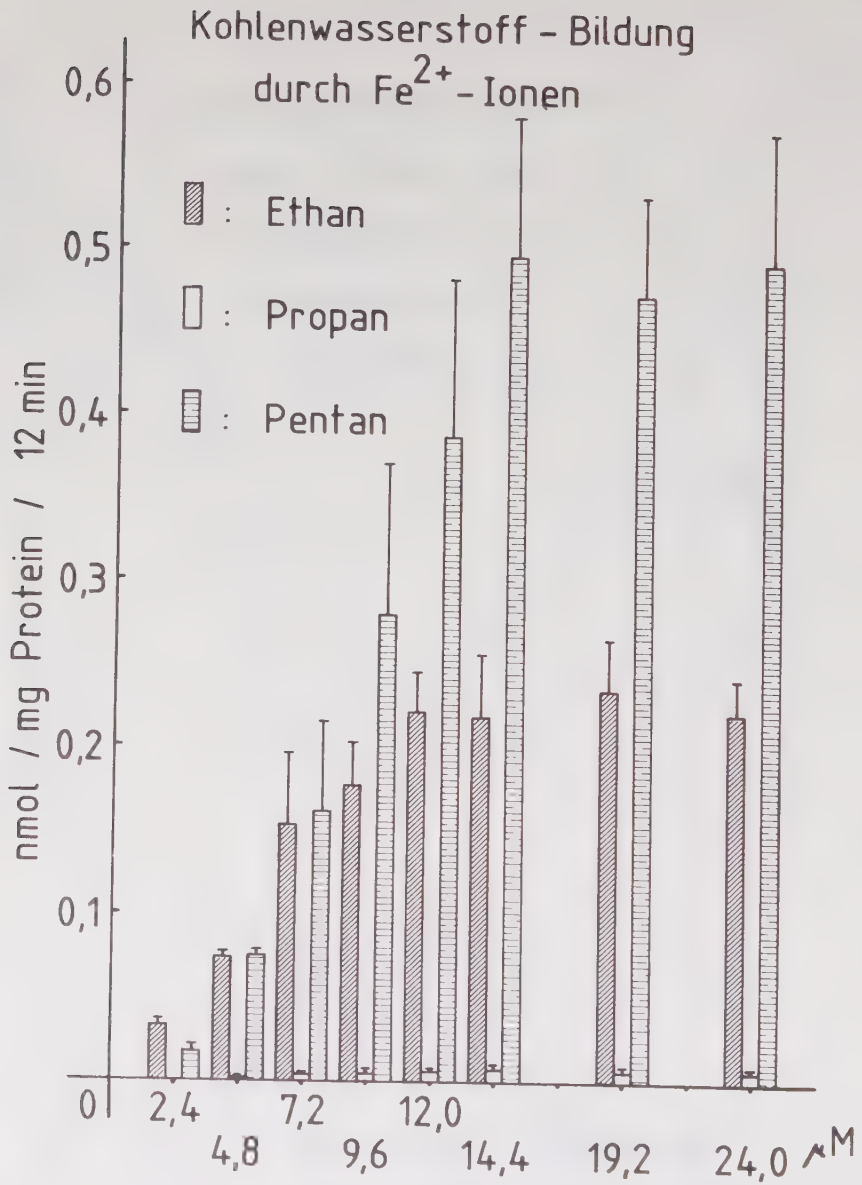


Abb. 13: Konzentrationsabhängigkeit der durch Fe^{2+}-Ionen ausgelösten Ethan-, Propan- und n-Pentan-Bildung in Lebermikrosomen (1 mg Protein/ml), die mit einem NADPH-regenerierenden System inkubiert wurden. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm s_x$ (n=3)

4.2.2. In vivo-Versuche

Nach den erfolgreichen Versuchen mit Lebermikrosomen, die eindeutig zeigten, daß Fe^{2+}-Ionen die Bildung der Alkane Ethan, Propan und n-Pentan auslösen können, untersuchten wir diese Fe^{2+}-induzierte Lipidperoxidation bei Ratten in vivo.
$FeCl_2.4H_2O$ wurde kurz vor den Versuchen in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Die Konzentration der Stammlösung betrug 75 ml $FeCl_2$ pro ml. Mit dieser Lösung wurden die Ratten durch intraperitoneale Injektion behandelt (o,4 bis o,8 ml Lösung/Tier). Die Dosierung der Eisen-Ionen erfolgte nach dem Gewicht der Ratten. Danach wurde jede Ratte sofort einzeln in die in vivo-Apparatur gesetzt.
Zu Beginn wurden die Apparaturen, in denen die Tiere bereits saßen, mit sehr reinem Sauerstoff gespült. Während der Versuche war das ganze System an ein Spirometer angeschlossen, das ebenfalls mit hoch gereinigtem Sauerstoff gefüllt war (s. 3.6. und 3.7.).
Alle Versuche dauerten 6 Stunden. Alle 3o min wurde eine Gasprobe aus der Apparatur entnommen und gaschromatographisch analysiert. Zur Kontrolle wurden Ratten mit einer äquivalenten Menge physiologischer Kochsalz-Lösung ebenfalls i.p. gespritzt.
Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse. Mit zunehmender Dosis der Fe^{2+}-Ionen wurden von den Tieren steigende Mengen von Ethan abgeatmet.
Die Dosis loo mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht stellte sich als Grenze für eine akute Behandlung heraus, da sehr viele Ratten, die höhere Fe^{2+}-Dosen erhalten hatten, während des Versuchs starben.
Die Kontrolltiere atmeten ca. 3 nmol Ethan/kg Körpergewicht innerhalb von 6 Stunden ab. Dieser Wert stimmt sehr gut mit

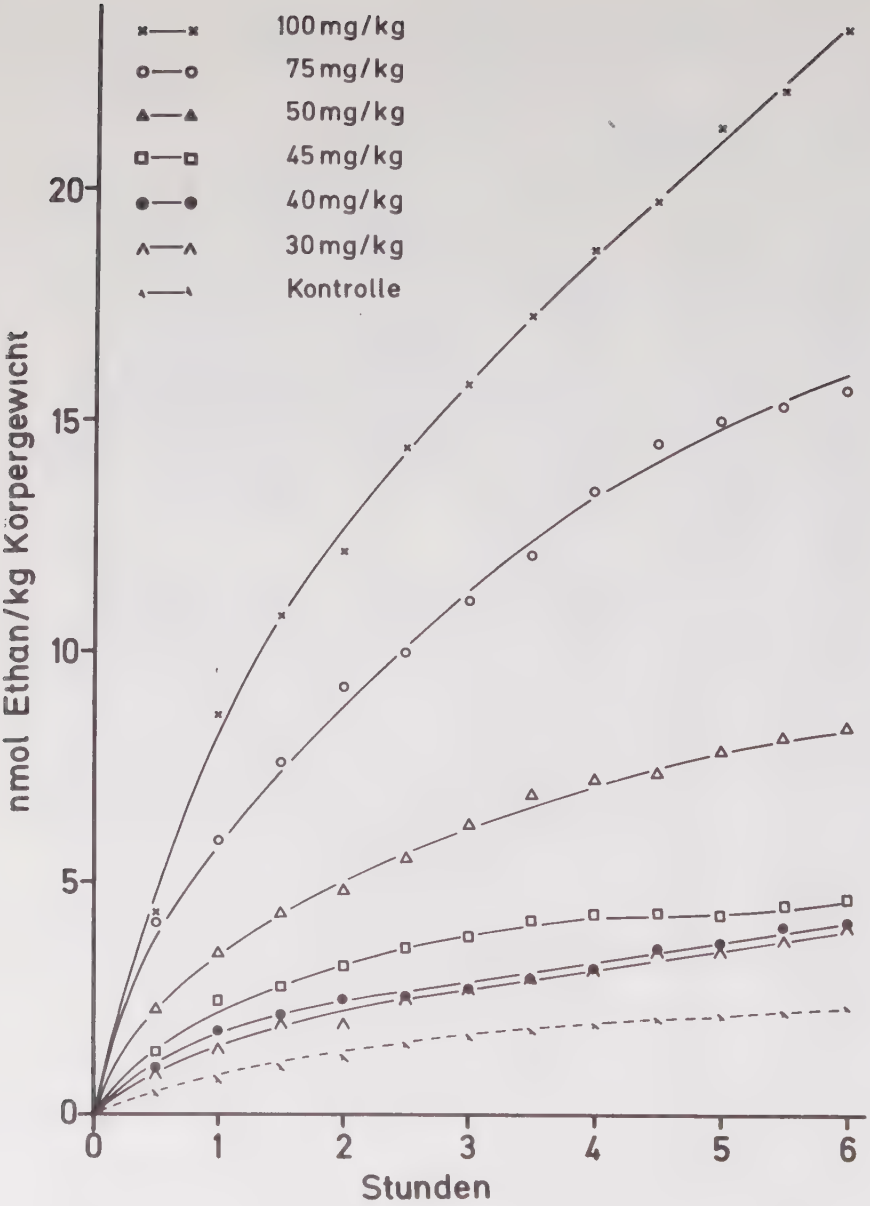


Abb. 14: In vivo-Ethan-Abatmung von Ratten nach Behandlung mit $FeCl_2$ i.p., das in o,9 %iger NaCl-Lösung gelöst wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils 6 Versuchen. Kontrolltiere wurden mit einer äquivalenten Menge o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. behandelt (n=2o)

dem Befund von 4.1.3. überein. Hierbei handelte es sich höchst wahrscheinlich um die Ethan-Bildung, die durch eine endogen ablaufende Lipidperoxidation im Organismus verursacht ist.

Abbildung 15 zeigt in einer anderen Darstellung die Ethan-Bildung, die nur durch Fe^{2+}-Ionen zustande kommt. Sie läßt erkennen, daß der Effekt der Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht sprunghaft ansteigt. Dies kann damit erklärt werden, daß freie Fe^{2+}-Ionen im Körper sofort von Eisenbindungsproteinen (Ferritin oder Hämosiderin) gebunden werden, die Transport- und Speicherfunktion für Eisen haben.
Aus diesem Befund läßt sich vermuten, daß Fe^{2+}-Ionen nur dann eine Lipidperoxidation auslösen können, wenn sie in freier Form und nicht als Ferritin oder Hämosiderin vorliegen,bzw. daß eine Fe^{2+}-induzierte Lipidperoxidation in vivo nur dann ausgelöst werden kann, wenn die Fe^{2+}-Dosis höher ist als der Eisenspeicherkapazität des Körpers entspricht.
Daß die überschüssigen Eisen-Ionen aus dem Körper entfernt werden,bzw. daß durch Neusynthese der Eisenbindungsproteine neue Speicher gebildet werden, kann durch Messung der Ethan-Bildung herausgefunden werden. Deshalb wurden die Ratten, die am 1. Tag mit 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht behandelt worden waren, nach dem Versuch in normale Käfige (mit Futter und Wasser) gesetzt und ihre Ethan-Abatmung am nächsten Tag ohne weitere Behandlung noch einmal gemessen, und zwar unter denselben Bedingungen wie am Vortage.
Als Kontrollen wurden die Ratten verwendet, die mit o,9 %iger NaCl-Lösung am Vortage behandelt worden waren und anschließend ebenfalls 6 Stunden lang im Versuch gewesen waren.
Abbildung 16 zeigt, daß die Ethan-Bildung am 2. Tag nach der Behandlung der Ratten mit Eisen-Ionen deutlich niedriger war als am 1. Tag. Wenn die Ratten am 3. Tag noch einmal in die in vivo-Apparatur gebracht wurden und die Ethan-Bildung verfolgt wurde, ergaben sich Werte, die in der gleichen Größenordnung lagen, wie die bei den Kontrollen (s. Abb. 48, 49).

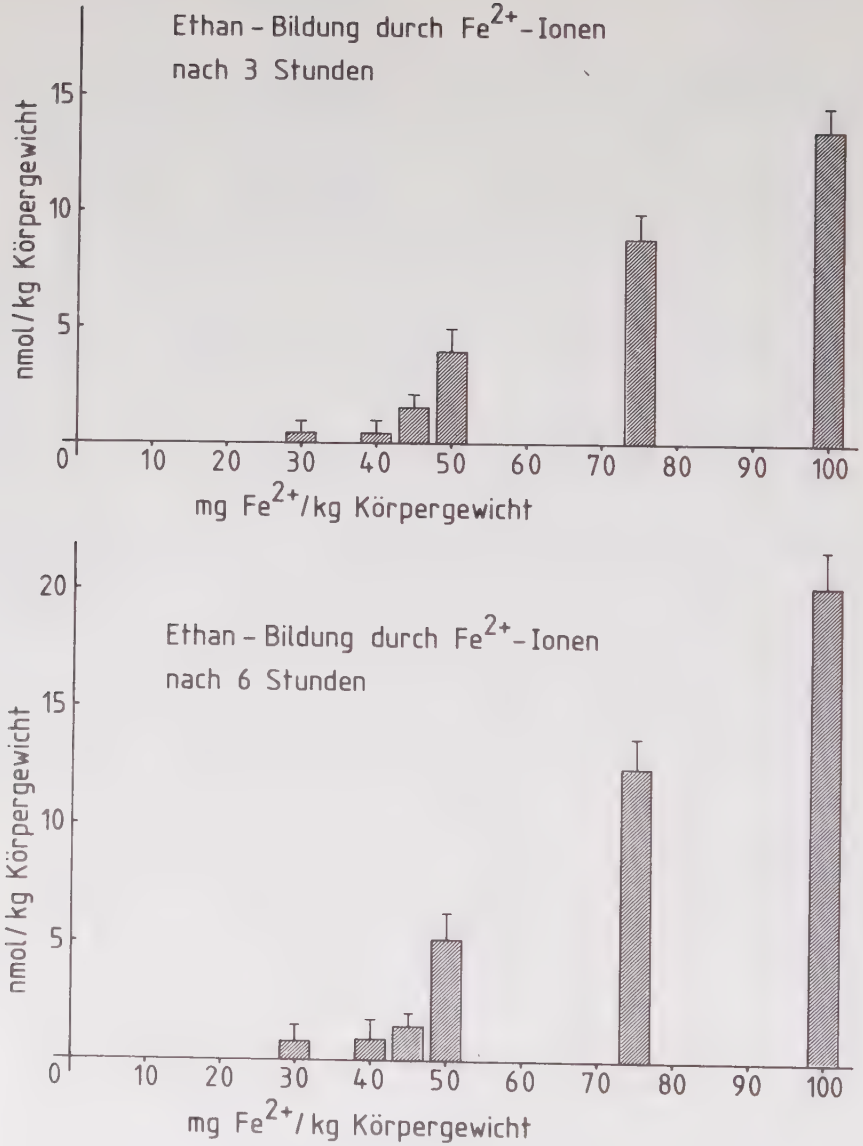


Abb. 15: In vivo-Ethan-Bildung von Ratten (n=6) in Abhängigkeit von der Fe^{2+}-Dosis 3 Stunden (oben) und 6 Stunden (unten) nach der Behandlung. Die dargestellten Werte sind die Resultate aus den jeweils gemessenen Ethan-Mengen abzüglich der Ethan-Mengen, die Kontrolltiere bildeten (s. Abb.14)

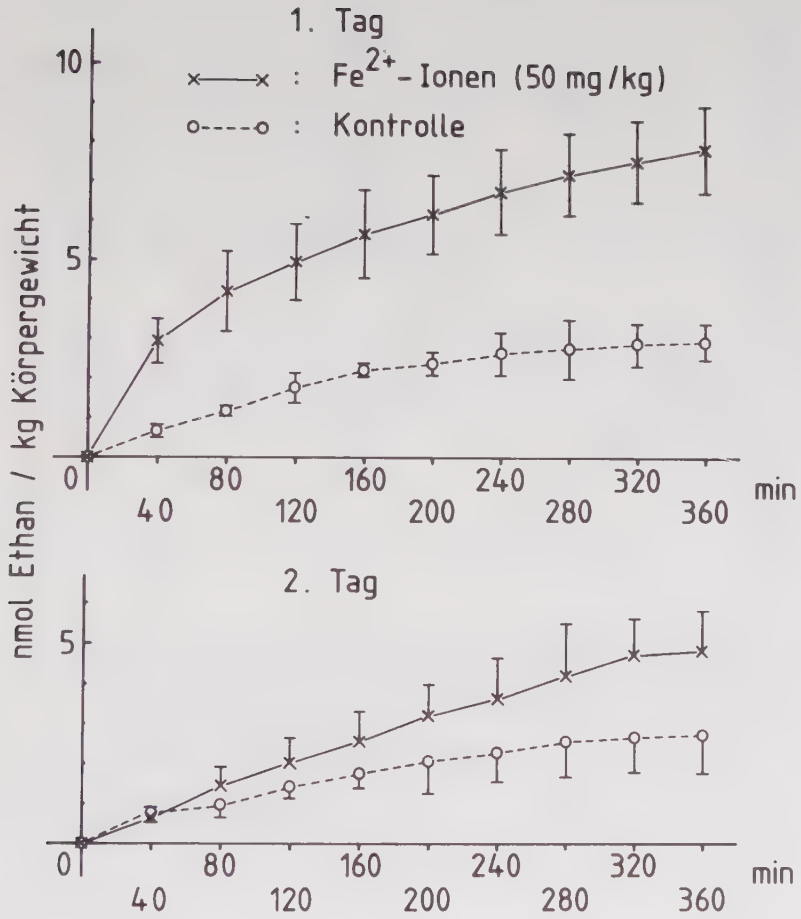


Abb. 16: In vivo-Ethan-Bildung von Ratten unmittelbar nach der Behandlung (1. Tag) und 24 Stunden später (2. Tag). Kontrollratten erhielten am 1. Tag eine äquivalente Menge einer o,9 %igen NaCl-Lösung.
Mittelwerte $\pm$ s_x (n=11)

Alle bisher beschriebenen in vivo-Versuchè wurden in Apparaturen durchgeführt, die am Anfang mit sehr reinem Sauerstoff gespült worden waren. Die Ratten befanden sich somit während des gesamten Versuches in einer Atmosphäre mit sehr hohem Sauerstoffgehalt. Obwohl die Gefahr eines Sauerstoff-Effektes während eines 6-stündigen Versuchs nicht bestand, wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Ratten in Apparaturen gesetzt wurden, die vor der Ethan-Messung mit Kohlenwasserstoff-freier Synthetischer Luft gespült worden waren. Zum Vergleich wurden parallele Versuche durchgeführt, bei denen mit reinem Sauerstoff gespült worden war (s. Abb. 14 - 16).

Abbildung 17 zeigt, daß sowohl bei der Behandlung der Tiere mit Fe^{2+}-Ionen als auch bei Kontrolltieren (Behandlung mit o,9 %iger NaCl-Lösung) keine Unterschiede in der abgeatmeten Ethan-Menge auftraten.

Abb. 17: In vivo-Ethan-Bildung von Ratten nach Behandlung mit 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht (x———x) bzw. nach Behandlung mit o,9 %iger NaCl-Lösung (O----O).
Links sind die Versuche dargestellt, bei denen Ratten (n = 2o) 1oo % O_2 atmeten, Mittelwerte $\pm$ s_x.
Rechts sind Versuche dargestellt, bei denen Ratten (n=4) KW-freie Synthetische Luft (79 % N_2/ 21 % O_2) atmeten, Mittelwerte $\pm$ s_x.

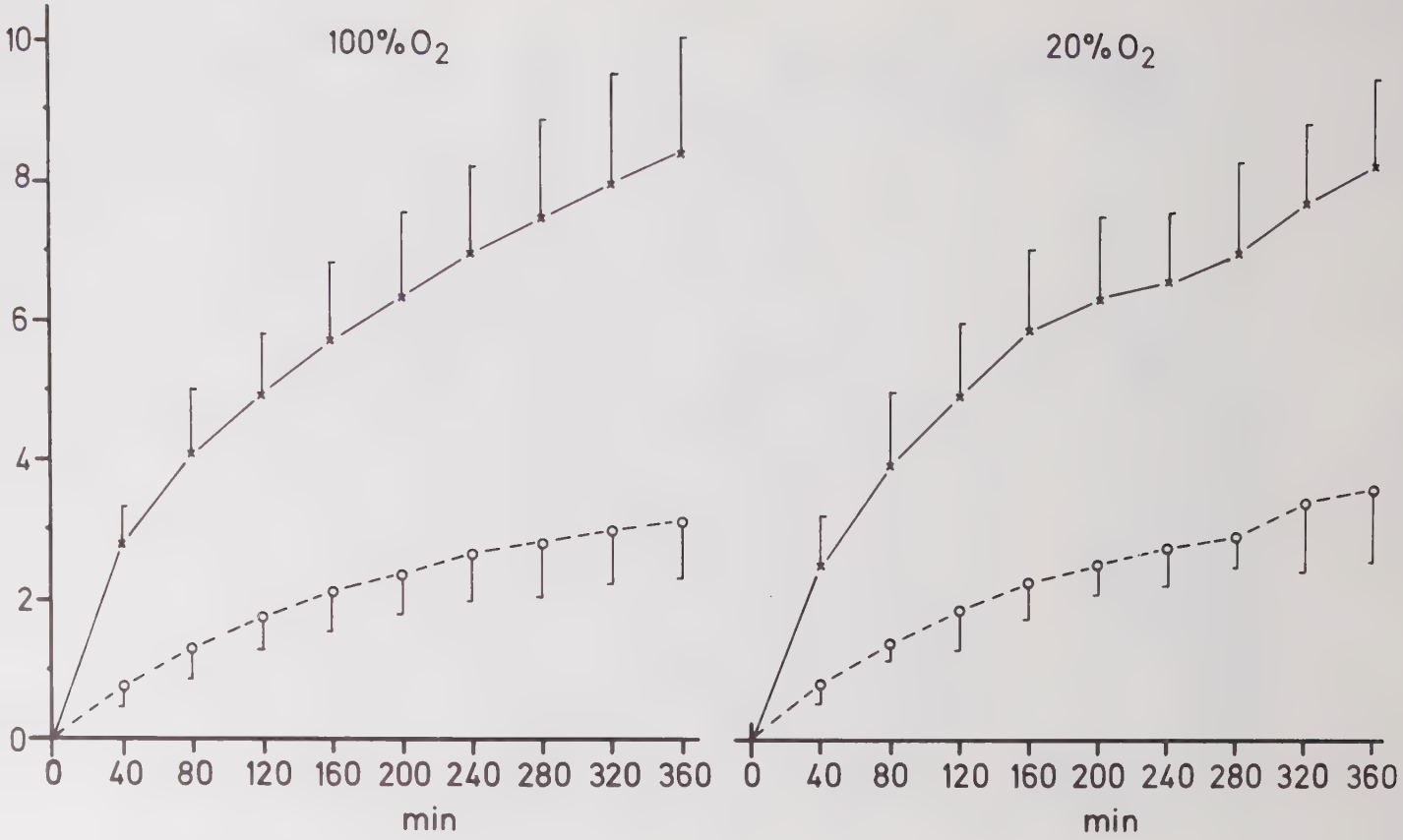

100% O_2
20% O_2
10
8
6
4
2
0
0 40 80 120 160 200 240 280 320 360
min
0 40 80 120 160 200 240 280 320 360
min

Abb. 17

4.2.3. Einfluß von (+)-Catechin auf die Fe^{2+}-ausgelöste Lipidperoxidation in vivo

Der Einfluß des Radikalfängers (+)-Catechin auf die Ethan-Bildung von Ratten, die mit Fe^{2+}-Ionen in vivo behandelt wurden, wurde untersucht. (+)-Catechin wurde in Borat-Puffer (pH 10,7) gelöst. Die Konzentration war 150 mg (+)-Catechin/ml.

Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurde die (+)-Catechin-Lösung an die Ratten mit Hilfe einer Schlundsonde per oral (p.o.) verabreicht (je nach Gewicht zwischen 0,5 und 0,7 ml). Eine Stunde später wurden denselben Tieren Fe^{2+}-Ionen in Form einer $FeCl_2$-Lösung in 0,9 %iger NaCl-Lösung i.p. appliziert (s. 4.2.2.).

Abbildung 18 zeigt den Einfluß von 300 mg (+)-Catechin/ kg Körpergewicht auf die Ethan-Bildung der Tiere, die mit 50 mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht behandelt waren. Die Ethan-Werte unterscheiden sich kaum von denen, die nur 50 mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht erhalten hatten. Beide Kurvenverläufe sind aber signifikant höher als bei den Kontrollversuchen, wo die Ethan-Bildung von Tieren, die mit 0,9 %iger NaCl-Lösung i.p. oder mit 300 mg (+)-Catechin/kg Körpergewicht p.o. und 0,9 %iger NaCl-Lösung i.p. behandelt worden waren, gemessen wurde.

Die anderen Kontrollversuche (Borat-Puffer und 0,9 %ige NaCl-Lösung bzw. 300 mg (+)-Catechin/kg Körpergewicht alleine) ergaben ähnliche Kurvenverläufe wie bei den dargestellten Kontrollversuchen (ohne Abbildung).

Der Kurvenverlauf der Ethan-Bildung von Tieren, die mit Borat-Puffer und 50 mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht behandelt wurden, war genau derselbe, wie der dargestellte bei Versuchen mit Fe^{2+}-Ionen (ohne Abbildung).

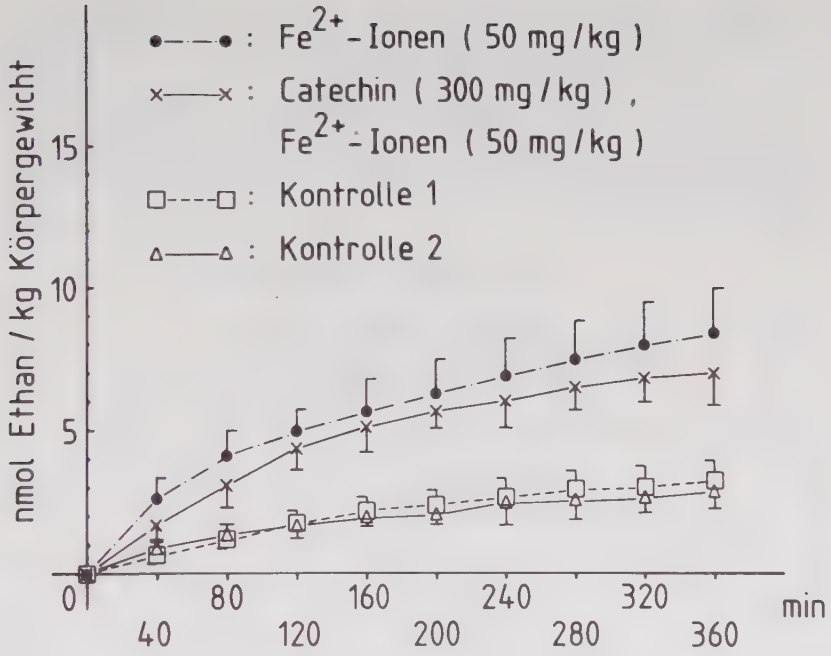


Abb. 18: In vivo-Ethan-Bildung von Ratten nach Behandlung mit:

●—·—·—●: 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=2o)
×——×: 3oo mg (+)-Catechin/kg KG p.o. und 1 Stunde später 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=6)
□---□: o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. und 1 Stunde später erneut o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=2o)
△——△: 3oo mg (+)-Catechin/kg KG p.o. und 1 Stunde später o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=6)

Mittelwerte $\pm$ s_x

Abbildung 19 zeigt den Einfluß von 3oo mg (+)-Catechin/kg Körpergewicht auf die Ethan-Bildung der Tiere, die mit 75 mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht behandelt waren. Bei diesem Versuch zeigte (+)-Catechin eine hemmende Wirkung auf die Fe^{2+}-ausgelöste Lipidperoxidation, auch wenn der Unterschied relativ gering war und erst nach 6 Stunden signifikant war ($P \leq o,ol$).

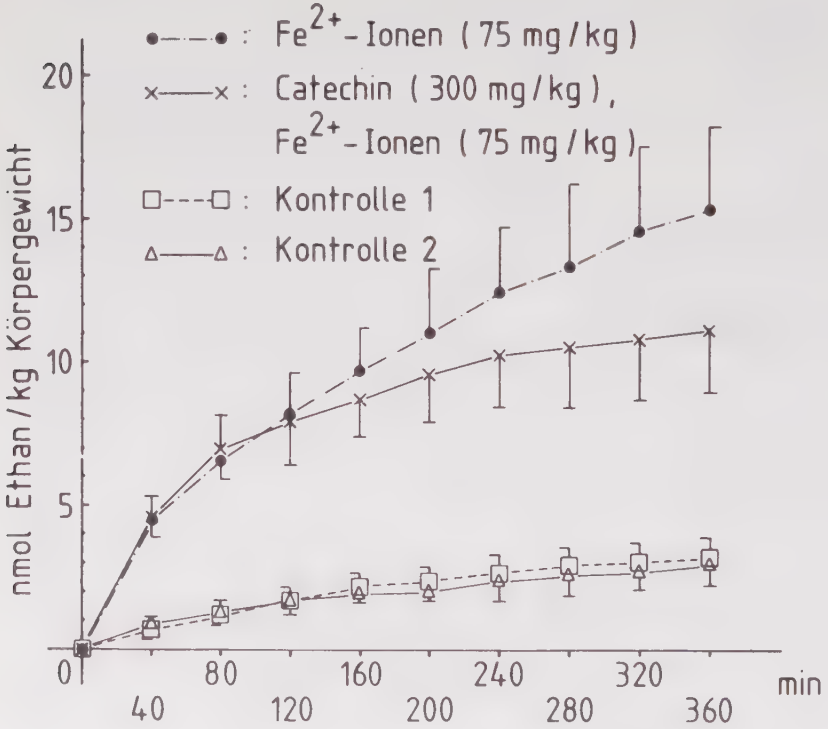


Abb. 19: In vivo-Ethan-Bildung von Ratten nach der Behandlung mit:
●—·—·—●: 75 mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=6)
×——×: 3oo mg (+)-Catechin/kg KG p.o. und 1 Stunde später 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=6)
□---□: o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=2o)
△——△: 3oo mg (+)-Catechin/kg KG p.o. und 1 Stunde später o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=6)
Mittelwerte $\pm s_x$. Der Unterschied zwischen Fe^{2+} und (+)-Catechin/Fe^{2+} ist bei 36o min statistisch signifikant ($P \leq o,ol$)

Als Kontrollversuche wurden nur die Zeitkurven der Ethan-Bildung von Tieren, die mit physiologischer Kochsalzlösung bzw. mit (+)-Catechin und physiologischer Kochsalzlösung behandelt worden waren, dargestellt. Die anderen Kontrollversuche waren, wie oben ausgeführt, mit diesen identisch. Borat-Puffer hatte hier ebenfalls keinen Einfluß auf die Ethan-Bildung der Tiere, die 75 mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht erhalten hatten (ohne Abbildung).

4.2.4. Einfluß von Silybin auf die Fe^{2+}-ausgelöste Lipidperoxidation in vivo

Der Einfluß von Silybin (Silymarin^R), dem ebenfalls Radikalfängereigenschaften zugeschrieben wurden (61), auf die Fe^{2+}-induzierte Lipidperoxidation in vivo wurde untersucht.

Silybin wurde in Form von Silybin-dihemisuccinat-Na-Salz in o,9 %iger NaCl-Lösung gelöst (5o mg/ml bzw. loo mg/ml). Eine Stunde vor dem Versuch wurden die Ratten mit Silybin-Lösung i.p. behandelt (je nach Gewicht zwischen o,5 ml und 1,o ml). Nach 6o min wurden Fe^{2+}-Ionen in Form von $FeCl_2$-Lösung in o,9 %iger NaCl ebenfalls i.p. appliziert (s. 4.2.2.).

Abbildung 2o zeigt den Einfluß von 15o,6 mg Silybin/kg Körpergewicht auf die Ethan-Bildung der Tiere, die 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht erhalten hatten. Sie unterscheidet sich nur wenig von der Ethan-Bildung der Tiere, die nur mit 5o mg Fe^{2+}-Ionen behandelt wurden. Bei Kontrollversuchen wurde den Tieren o,9 %ige NaCl-Lösung einmalig bzw. zweimalig i.p. appliziert.
Abbildung 21 zeigt den Einfluß von 15o,6 mg Silybin/kg Körpergewicht auf die Ethan-Bildung von Ratten, die 75 mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht erhalten hatten.

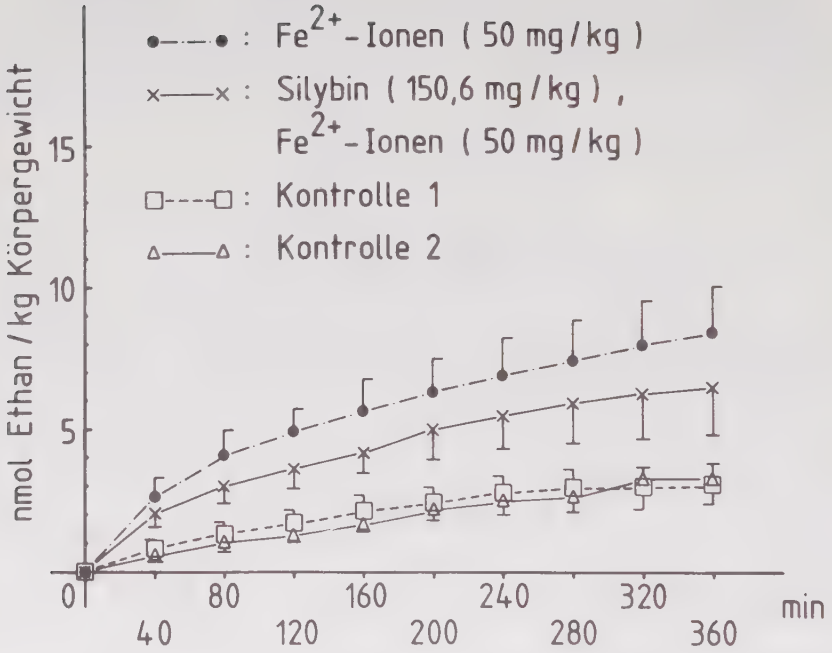


Abb. 20: In vivo-Ethan-Bildung von Ratten nach der Behandlung mit:

●—·—·—● : 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg i.p. (n=2o)

×———× : 15o,6 mg Silybin/kg KG i.p. und 1 Stunde später 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=6)

□----□ : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. und 1 Stunde später erneut o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=2o)

△———△ : 15o,6 mg Silybin/kg KG i.p. und 1 Stunde später o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=6)

Mittelwerte $\pm$ s_x

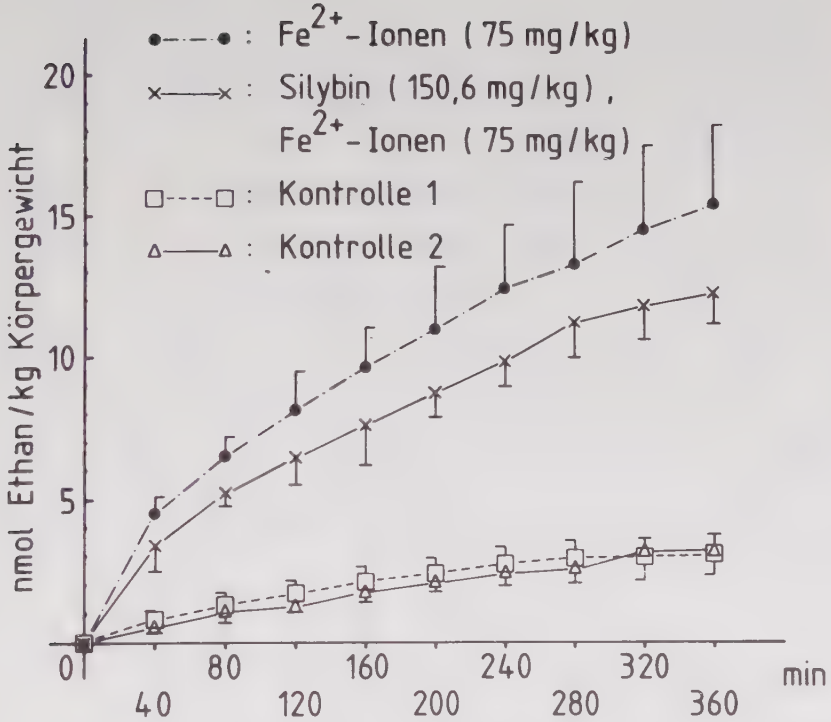


Abb. 21: In vivo-Ethan-Bildung von Ratten nach der Behandlung mit:

●—·—·—●: 75 mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=6)

×——×: 150,6 mg Silybin/kg KG i.p. und 1 Stunde später 75 mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=6)

□----□: 0,9 %iger NaCl-Lösung i.p. und 1 Stunde später erneut 0,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=20)

△——△: 150,6 mg Silybin/kg KG i.p. und 1 Stunde später 0,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=6)

Mittelwerte $\pm$ s_x

Sie unterscheidet sich auch hier nur wenig von der Ethan-Bildung der Tiere, die nur mit 75 mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht behandelt wurden. Bei den Kontrollversuchen wurde den Tieren o,9 %ige NaCl-Lösung einmalig bzw. zweimalig i.p. appliziert.

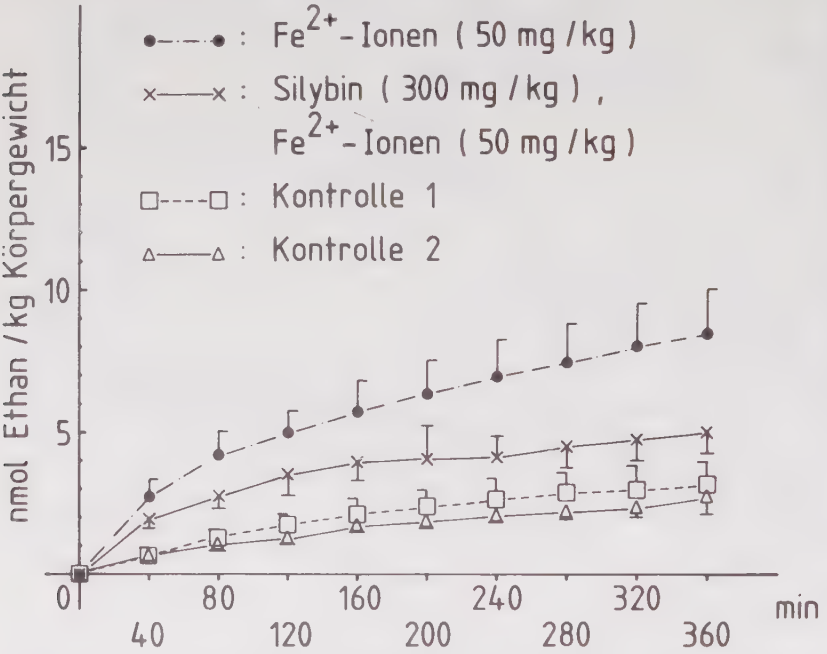


Abb. 22: In vivo-Ethan-Bildung von Ratten nach der Behandlung mit:
●—·—·—● : 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=2o)
×———× : 3oo mg Silybin/kg KG i.p. und 1 Stunde später 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=6)
□----□ : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. und 1 Stunde später erneut o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=2o)
△———△ : 3oo mg Silybin/kg KG i.p. und 1 Stunde später o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=6)
Mittelwerte $\pm$ s_x

Abbildung 22 zeigt den Einfluß von 3oo mg Silybin/kg Körpergewicht auf die Ethan-Bildung von Ratten, die 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht erhalten hatten. Sie ist signifikant niedriger als die Ethan-Bildung der Tiere, die nur mit 5o mg Fe^{2+}-Ionen behandelt wurden. Sie ist aber immer noch höher als der Ethan-Wert der Kontrolltiere, die entweder einmalig oder zweimalig mit o,9 %iger NaCl-Lösung behandelt worden waren.

Abbildung 23 zeigt den Einfluß von 3oo mg Silybin/kg Körpergewicht auf die Ethan-Bildung von Ratten, die 75 mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht erhalten hatten. Der Hemmeffekt auf die Ethan-Bildung ist hier sehr deutlich ausgeprägt gegenüber der Ethan-Bildung der Tiere, die nur mit 75 mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht behandelt wurden.
Als Kontrollversuche wurde die Ethan-Bildung von Tieren gemessen, die einmalig bzw. zweimalig mit o,9 %iger NaCl-Lösung behandelt worden waren.

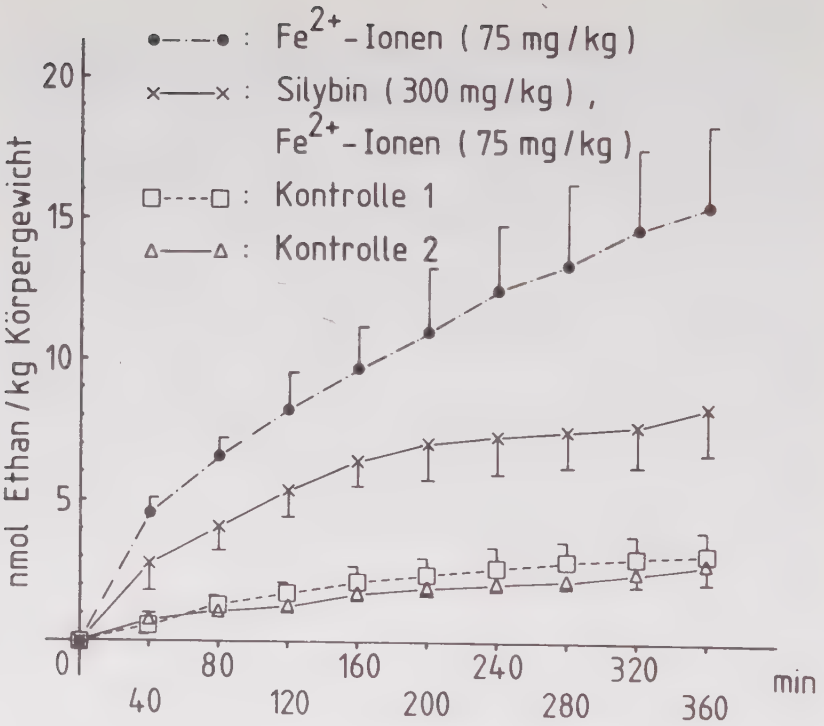


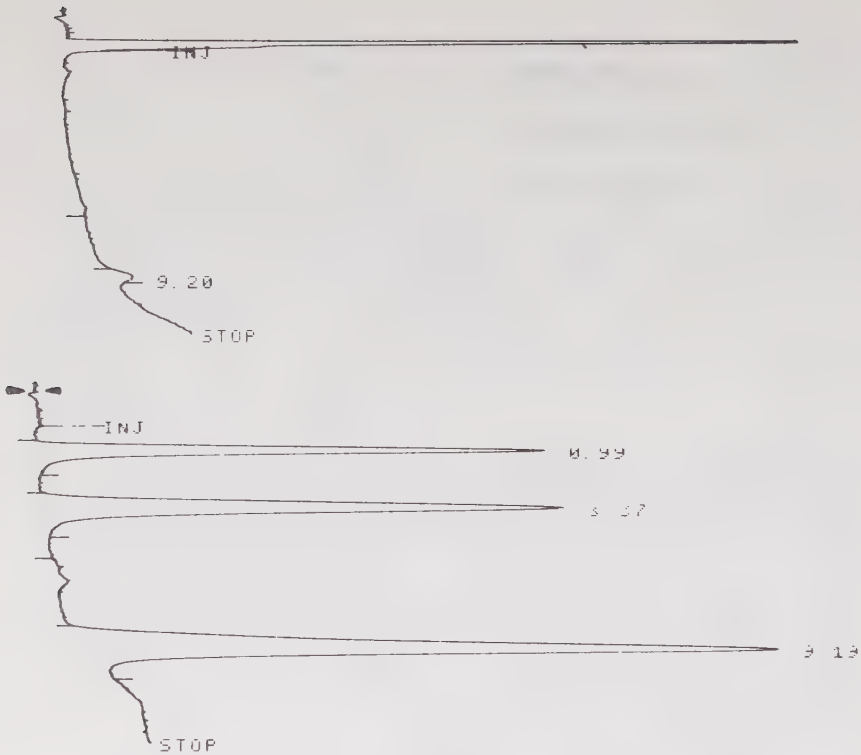
Abb. 23: In vivo-Ethan-Bildung von Ratten nach der Behandlung mit:
●—·—●: 75 mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=6)
×——×: 3oo mg Silybin/kg KG i.p. und 1 Stunde später 75 mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=6)
□----□: o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. und 1 Stunde später erneut o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=2o)
△——△: 3oo mg Silybin/kg KG i.p. und 1 Stunde später o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=6)
Mittelwerte + $s_{\bar{x}}$. Der Unterschied zwischen Fe^{2+} und Silybin/Fe^{2+} ist bei 36o min statistisch signifikant ($P \leqslant o,ol$).

4.3. Versuche mit Bleomycin

4.3.1. In Lebermikrosomen

Der Einfluß des Antibiotikums Bleomycin (BLM), das in der Klinik als Zytostatikum bei der Tumortherapie verwendet wird, auf die mikrosomale Lipidperoxidation wurde untersucht. Dazu wurde das Bleomycin-Präparat in KCl-Tris-Puffer gelöst (s. 3.1.). Die Konzentration dieser Stammlösung war 1 mg Bleomycin/ml Puffer.
o,2 ml bzw. o,5 ml Bleomycin-Lösung wurden 2 min vor dem Start der Reaktion (s. 3.4.) zu dem Inkubat zugegeben. Abbildung 24 zeigt ein Originalchromatogramm der Alkan-Bildung in Lebermikrosomen in Gegenwart von Bleomycin. Zum Vergleich ist ein Eichgas-Chromatogramm dargestellt.

Abbildung 25 zeigt die einzelnen Chromatogramme der Gasproben aus den Mikrosomen-Inkubationen mit Bleomycin (links) im Vergleich zu Inkubationen ohne Bleomycin (rechts). Sie zeigen nur einen geringen Einfluß von Bleomycin auf normale mikrosomale Alkan-Bildung.
Da der Bleomycin-Fe^{2+}-Komplex Sauerstoff aktivieren kann, wurde der Einfluß von Bleomycin auf die durch Fe^{2+}-Ionen induzierte Alkan-Bildung in Lebermikrosomen untersucht. Die Konzentration des Bleomycins betrug 4×10^{-5} g/ml Inkubat. Diese Bleomycin-Lösung wurde 2 min vor dem Start der Reaktion zugegeben.



	RT	TYPE	AREA	AREA %
	99		57929	21.23
3	37		83745	30.69
9	19		131158	48.07

HP 3380A
CLK OFF STOP 20 REJECT 100
M .30 ATTN 4

Abb. 24: Original-Chromatogramm einer Gasprobe einer Mikrosomen-Inkubation mit BLM und NADPH-reg. System nach 3o min (oben) und Original-Chromatogramm des Prüfgases (unten). RT o.99 ist Ethan, RT 3.37 ist Propan und RT 9.19 (bzw. RT 9.2o) ist n-Pentan

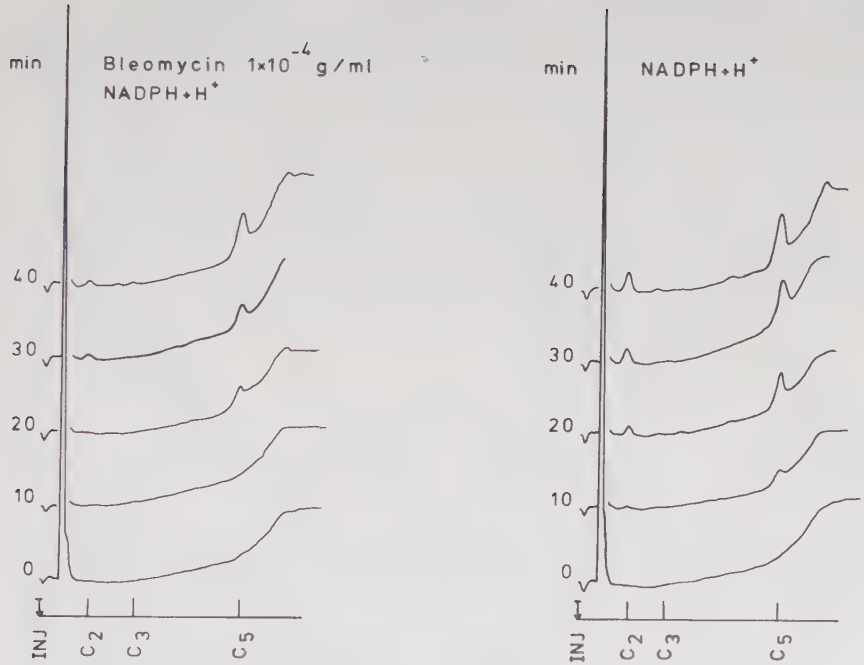


Abb. 25: Aufzeichnung der Original-Chromatogramme der Gasproben nach Inkubation von 10^{-4} g BLM/ml mit Lebermikrosomen und NADPH-reg. System (links) bzw. nach Inkubation mit Lebermikrosomen und NADPH-reg. System aber ohne BLM (rechts).
INJ bedeutet Probenaufgabe, C_2 ist Ethan, C_3 ist Propan und C_5 ist n-Pentan.
Ein repräsentatives Experiment ist dargestellt.

Abbildung 26 zeigt die Zeitkurven der mikrosomalen Alkan-Bildung durch Fe^{2+}-Ionen in Gegenwart von Bleomycin (rechts) und die Zeitkurven der Alkan-Bildung durch Fe^{2+}-Ionen alleine (links) bezogen auf die Menge des vorhandenen mikrosomalen Proteins.

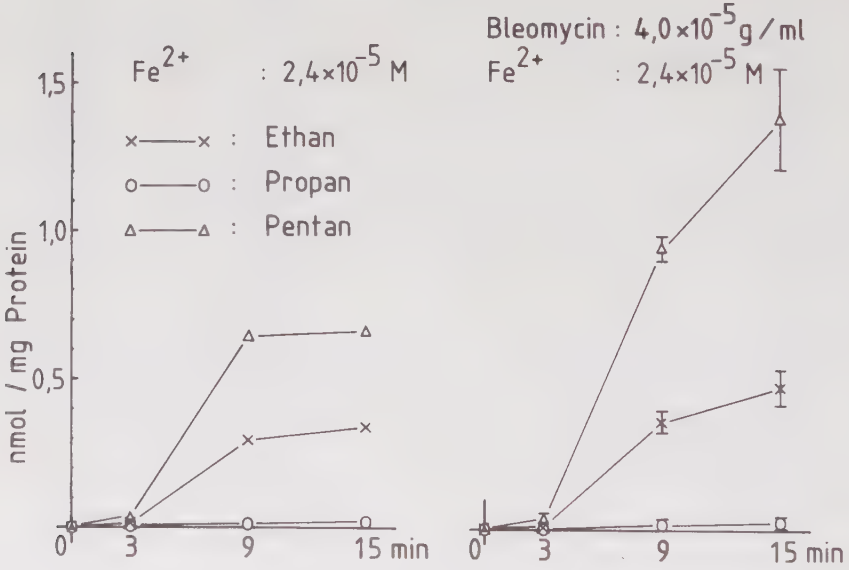


Abb. 26: Alkan-Bildung in Rattenlebermikrosomen in Gegenwart eines NADPH-reg. Systems, ausgelöst durch BLM und Fe^{2+}-Ionen (rechts) bzw. nur durch Fe^{2+}-Ionen (links).
Links ist ein repräsentatives Experiment dargestellt (s. Abb. 1o - 12). Rechts sind die Mittelwerte $\pm$ s_x von 3 Versuchen aufgezeichnet.

Aus der Abbildung sieht man deutlich, daß wesentlich mehr Ethan und n-Pentan gebildet werden, wenn Bleomycin und Fe^{2+}-Ionen vorhanden sind, als in Gegenwart von Fe^{2+}-Ionen alleine.
Dieser Befund spricht dafür, daß der Bleomycin-Eisen-Komplex zumindest in Lebermikrosomen zu einer verstärkten Lipidperoxidation führt. Der Einfluß von DNS auf die durch Bleomycin und Fe^{2+}-Ionen induzierte mikrosomale Alkan-Bildung wurde ebenfalls untersucht. Für diese Versuche wurde die DNS in KCl-Tris-Puffer gelöst(2,5 mg/ml) und zusammen mit der Mikrosomensuspension vor der Bleomycin- bzw. Fe^{2+}-Ionen-Zugabe in die Inkubationsgefäße einpipettiert (die Endkonzentration war o,2 mg DNS/ml).
Abbildung 27 zeigt, daß DNS auf die Alkan-Bildung keinen Einfluß hat. Dies läßt sich vermuten, da der Bleomycin-Fe^{2+}-Komplex auch ohne Bindung an DNS Sauerstoff-Radikale erzeugen kann, die eine Lipidperoxidation auslösen.

In Tabelle 1 wurden die verschiedenen Möglichkeiten geprüft, wie die einzelnen Parameter miteinander in Wechselwirkung treten könnten. Die Tabelle zeigt, daß die Alkan-Bildung außer von NADPH auch von Fe^{2+}-Ionen abhängig ist, und daß die Steigerung der Fe^{2+}-induzierten Alkan-Bildung wirklich durch die Interaktion von Bleomycin mit Fe^{2+} verursacht ist (Abb. 26 und 27). Die DNS hatte praktisch keinen Einfluß auf die Alkan-Bildung. Es wurde zusätzlich überprüft, ob die Erhöhung der Alkan-Bildung tatsächlich durch Bleomycin-Fe^{2+}-Komplexe bedingt war. Dazu wurden äquimolare Lösungen von Bleomycin und Fe^{2+}-Ionen gemischt (die Lösung war hellgelb). Die Reaktion wurde durch gleichzeitige Zugabe von $NADP^+$- , DNS- und dieser Bleomycin-Fe^{2+}-Lösung zu den Mikrosomen gestartet.
Die Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse.

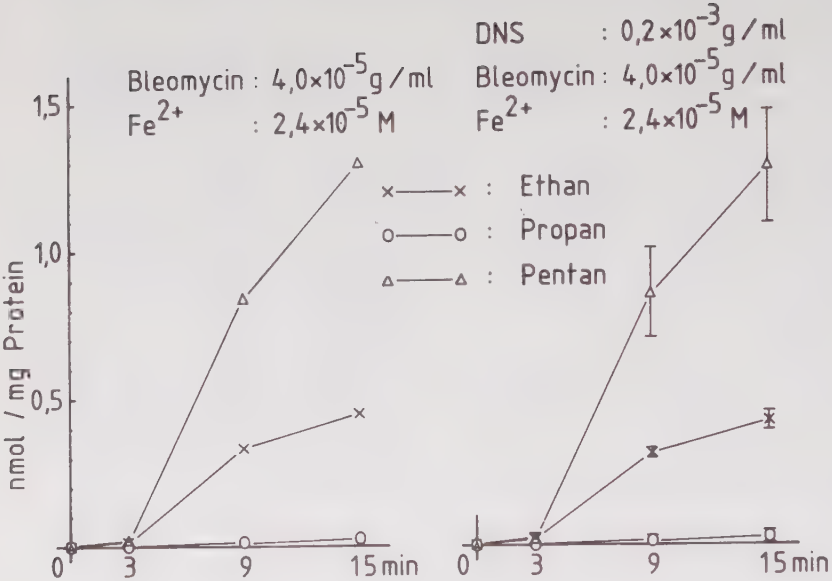


Abb. 27: Alkan-Bildung in Rattenlebermikrosomen in Gegewart eines NADPH-reg. Systems ausgelöst durch BLM und Fe^{2+}-Ionen (linke Abbildung) bzw. durch BLM und Fe^{2+}-Ionen aber in Gegenwart von DNS (rechte Abbildung).
Links ist ein repräsentatives Experiment dargestellt (s. Abb. 26). Rechts sind die Mittelwerte $\pm$ s_x von 3 Versuchen abgebildet.

Tabelle 1
Alkan-Bildung in Rattenlebermikrosomen (1 mg mikrosomales Protein/ml) in Gegenwart von Na-Isocitrat und ICDH in Abhängigkeit von BLM, Fe^{2+}-Ionen, $NADP^+$ und DNS.
Die DNS-Lösung wurde zusammen mit der Mikrosomen-Suspension einpipettiert. Die BLM-Lösung wurde 2 min vor dem Start der Reaktion zugegeben. Die Reaktion wurde durch gleichzeitige Zugabe von $NADP^+$-Lösung und Fe^{2+}-Ionen gestartet.
Wenn ein Bestandteil nicht zugesetzt wurde, wurde stattdessen dieselbe Menge an Puffer zugegeben.
Soweit vorhanden, sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen (s_x) aus einzelnen Versuchen (n=Anzahl) angegeben.

	Zusatz von	nmol Alkan/mg mikrosomales Protein / 15 min			n
		Ethan	Propan	n-Pentan	
1		-	-	-	3
2	$NADP^+$	-	-	-	2
3	BLM	o,oo1	-	o,oo3	2
4	BLM u.$NADP^+$	-	-	-	2
5	Fe^{2+}	o,oo6	-	o,o16	2
6	Fe^{2+} u.$NADP^+$	o,219 ± o,o28	o,oo9 ± o,oo1	o,6o9 ± o,o33	3
7	BLM u. Fe^{2+}	o,oo6	-	o,o18	2
8	BLM,Fe^{2+} und $NADP^+$	o,451	o,o2o	1,3o2	2
9	DNS	-	-	-	1
10	DNS u. $NADP^+$	-	-	-	1
11	DNS u. BLM	o,oo1	-	o,oo2	2
12	DNS, BLM u. $NADP^+$	o,oo1	-	-	2
13	DNS u. Fe^{2+}	o,oo9	-	o,o29	1
14	DNS, Fe^{2+} und $NADP^+$	o,27o	o,oo7	o,546	2
15	DNS, BLM und Fe^{2+}	o,oo3	-	o,o12	1
16	DNS, BLM, Fe^{2+} und $NADP^+$	o,418 ± o,o35	o,o19 ± o,oo1	1,278 ± o,191	3

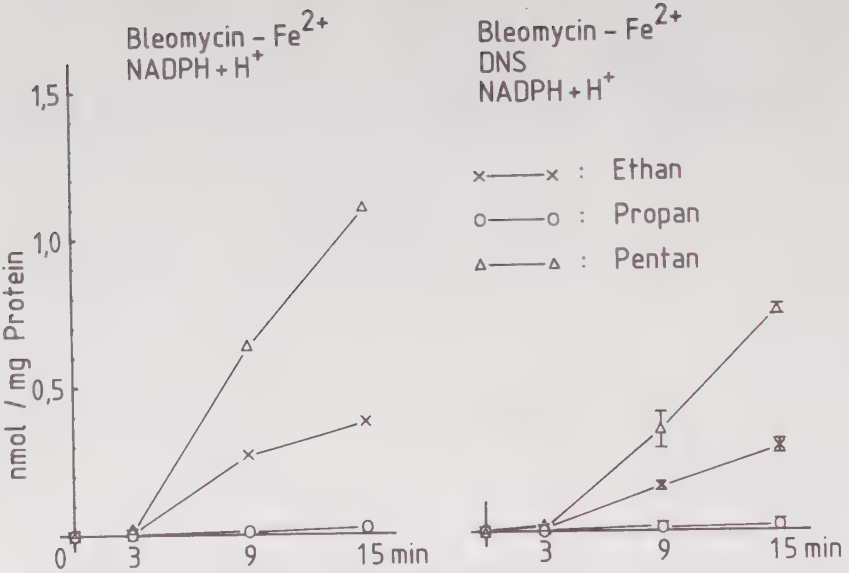


Abb. 28: Alkan-Bildung in Rattenlebermikrosomen in Gegenwart eines NADPH-reg. Systems ausgelöst durch einen BLM-Fe^{2+}-Komplex (linke Abb.) bzw. durch einen BLM-Fe^{2+}-Komplex in Gegenwart von DNS (rechte Abb.). Die Endkonzentrationen im Inkubat waren:

BLM	4×10^{-5} g/ml
Fe^{2+}-Ionen	$2{,}4 \times 10^{-5}$ M
DNS	$0{,}2 \times 10^{-3}$ g/ml

Links ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt (s. Abb. 26). Rechts sind die Mittelwerte $\pm s_x$ von 3 Versuchen abgebildet.

Aus der linken Abbildung sieht man, daß tatsächlich der Bleomycin-Fe^{2+}-Komplex für die Erhöhung der Ethan-Bildung verantwortlich ist, während die DNS (rechte Abbildung) unter diesen Bedingungen als Hemmstoff wirkte.

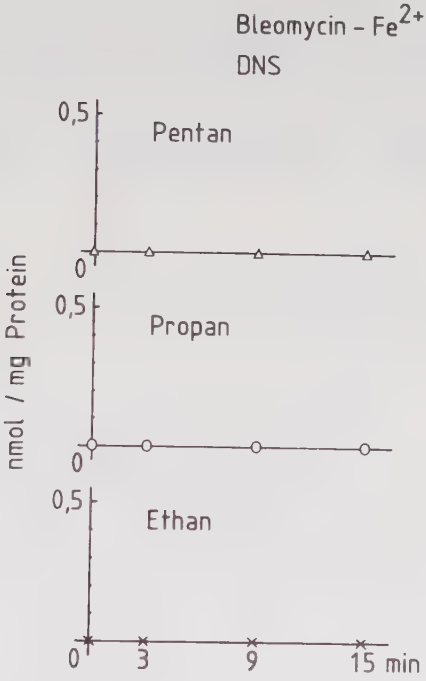


Abb. 29: Kontrollversuch einer Inkubation mit Rattenlebermikrosomen, die BLM-Fe^{2+}-Komplex und DNS aber kein $NADP^+$ enthielt. Dieselben Konzentrationen, wie in Abb. 28 erwähnt, wurden verwendet. Es sind repräsentative Ergebnisse dargestellt.

4.3.2. In vivo-Versuche

Die in vivo-Versuche wurden in speziellen Apparaturen durchgeführt (s. 3.6. und 3.7.).
Das Bleomycin-Präparat wurde in o,9 %iger NaCl-Lösung gelöst. Die Konzentration der Stammlösung wurde so gewählt, daß die injizierte Menge pro Ratte o,4 ml bis 1,o ml betrug.
Die Ethan-Bildung der Ratten, die mit 3o mg Bleomycin/mg Körpergewicht behandelt wurden, ist in Abbildung 3o dargestellt. Zur Kontrolle wurden Ratten mit äquivalentem Volumen einer o,9 %igen NaCl-Lösung i.p. gespritzt. Die beiden Zeit-Kurven unterscheiden sich während der gesamten Versuchsdauer praktisch nicht.

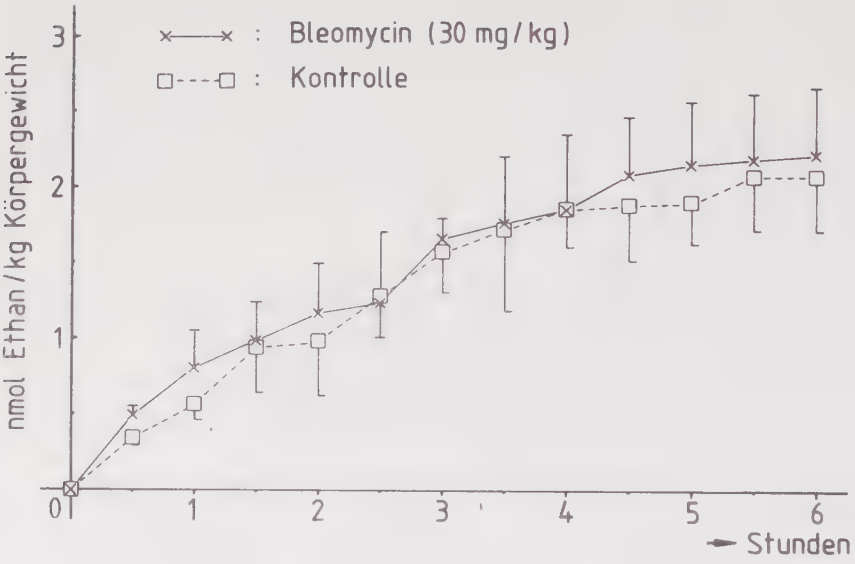


Abb. 3o: In vivo-Ethan-Bildung von Ratten nach der Behandlung mit:
×——× : 3o mg BLM/kg KG i.p. (n=4)
□-----□ : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=4)
Mittelwerte $\pm$ s_x sind dargestellt

Am nächsten Tag wurden dieselben Ratten noch einmal mit 3o mg Bleomycin/kg Körpergewicht i.p. gespritzt, während die Kontrollratten noch einmal mit o,9 %iger NaCl-Lösung ebenfalls i.p. gespritzt wurden. Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse. Auch in diesen Versuchen atmeten die beiden Versuchsgruppen fast gleichviel Ethan ab. Die Ethan-Menge war bei den mit Bleomycin-behandelten Ratten eher etwas geringer als bei den Kontrollratten. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

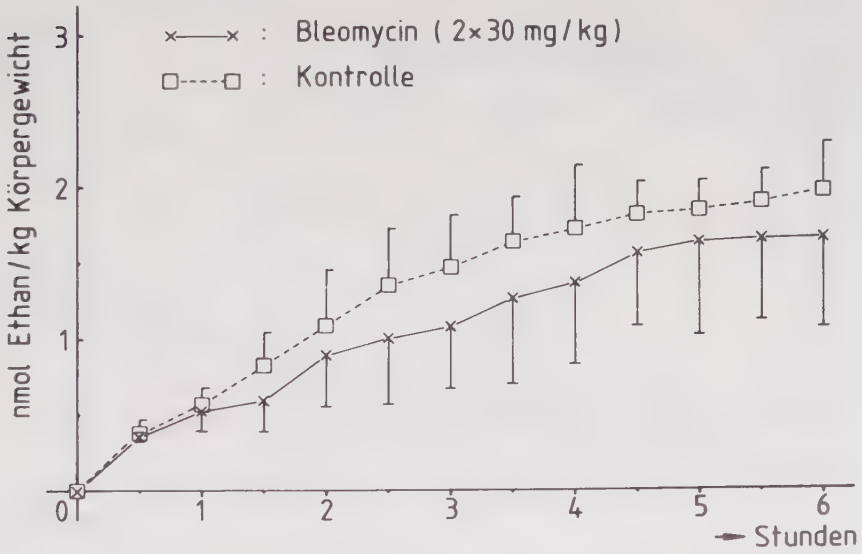


Abb. 31: Ethan-Bildung von Ratten, denen am 1. Tag 3o mg BLM/kg KG gespritzt worden war (s. Abb. 3o) und die am 2. Tag (24 Stunden nach der ersten Dosis) zur Zeit O Stunden noch einmal mit 3o mg BLM/kg KG i.p. gespritzt wurden (x——x) (n=4) bzw. von entsprechenden Kontrollratten, die zweimal mit o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. gespritzt wurden (□----□) (n=4). Mittelwerte $\pm$ s_x sind dargestellt.

Es wurden außerdem Versuche mit einer relativ hohen Bleomycin-Dosis durchgeführt, bei denen Ratten mit 71,4 mg Bleomycin/kg Körpergewicht (Gesamtinhalt einer Ampulle pro Ratte) i.p. gespritzt wurden. Die Ethan-Bildung dieser Ratten wurde 4 Tage lang verfolgt. Jeden Tag wurden die Ratten 6 Stunden lang in die Apparatur gesetzt und das abgeatmete Ethan gaschromatographisch analysiert.
In Abbildung 32 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

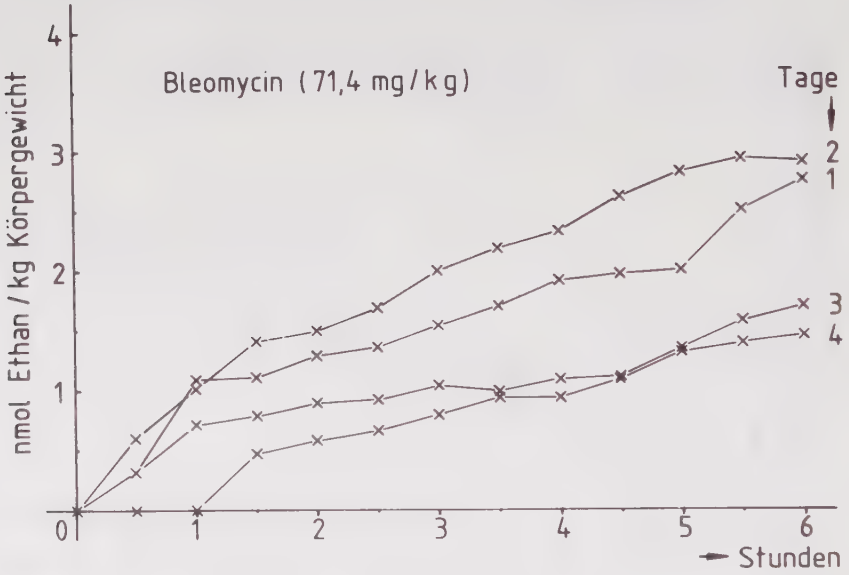


Abb. 32: Ethan-Bildung von Ratten, die mit einer einmaligen Dosis von 71,4 mg BLM/kg KG i.p. gespritzt wurden (n=2). Die Ratten wurden jeden Tag (Zeit O) 6 Stunden lang in die Apparatur gesetzt. Die Ethan-Abatmung wurde gaschromatographisch analysiert. Nach der Ethan-Messung wurden sie wieder im normalen Käfig im Tierstall gehalten. Die Ethan-Messung begann unmittelbar (1. Tag), 24 Stunden (2. Tag), 48 Stunden (3. Tag und 72 Stunden (4. Tag) nach der BLM-Injektion. Die Mittelwerte von 2 Tieren sind aufgezeichnet.

Die Abbildung zeigt, daß die Ratten vom 3. Tag an weniger Ethan abatmeten, sowohl im Vergleich mit dem 1. und 2. Tag als auch im Vergleich mit den Kontrollratten, die nur mit o,9 %iger NaCl Lösung gespritzt wurden (Abb. 33).

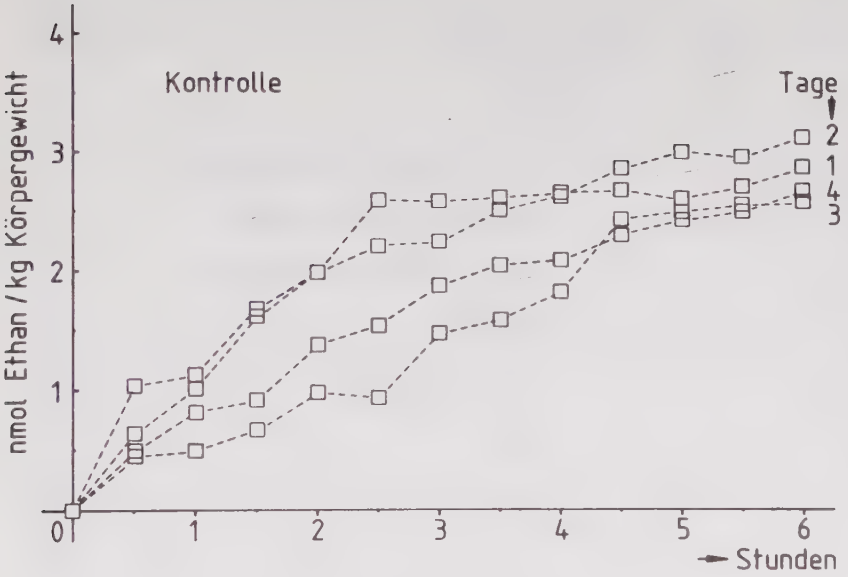


Abb. 33: Ethan-Bildung der Kontrollratten (n=2), die einmalig mit einer äquivalenten Menge einer o,9 %igen NaCl-Lösung i.p. gespritzt wurden. Die Ethan-Bildung wurde jeden Tag 6 Stunden lang (Beginn bei Zeit O Stunden) verfolgt, parallel mit den BLM-behandelten Ratten (s. Abb. 32). Die Mittelwerte von 2 Ratten sind aufgezeichnet.

Während dieser Versuche wurde beobachtet, daß die Ratten einen erheblichen Gewichtsverlust erlitten, was in der Literatur bereits beschrieben ist (62).

Ebenfalls in vivo wurde der Einfluß von Bleomycin auf die durch Fe^{2+}-Ionen induzierbare Ethan-Bildung untersucht. Versuchsratten wurden zuerst mit 3o mg Bleomycin/kg Körpergewicht (gelöst in o,9 %iger NaCl-Lösung) i.p. gespritzt. Eine Stunde danach wurden sie mit 5o mg Fe^{2+}/kg Körpergewicht ($FeCl_2$ gelöst in o,9 %iger NaCl-Lösung) ebenfalls i.p. gespritzt und dann sofort in die Apparaturen gesetzt. Die Ethan-Abatmung wurde gaschromatographisch verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt.

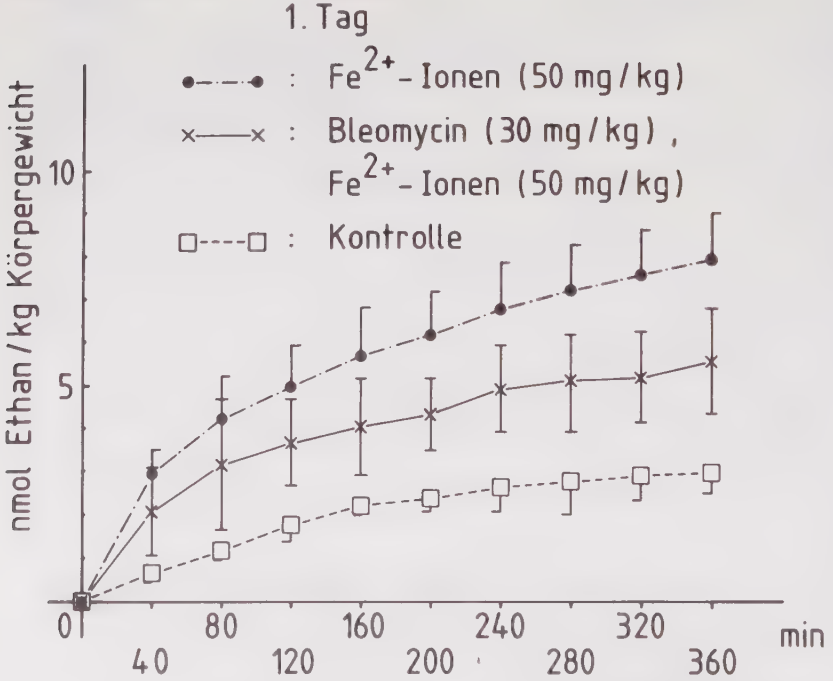


Abb. 34: In vivo-Ethan-Bildung von Ratten nach der Behandlung mit:
•—·—·—• : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. und 1 Stunde später 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=4)
×———× : 3o mg BLM/kg KG i.p. und 1 Stunde später 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=4)
□----□ : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. und 1 Stunde später erneut o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=4)
Mittelwerte $\pm$ s_x sind dargestellt

Sie zeigen den zeitlichen Verlauf der Ethan-Bildung der Ratten, die mit Bleomycin und Fe^{2+}-Ionen behandelt wurden, im Vergleich zu der Ethan-Abatmung von Ratten, die entweder nur mit o,9 %iger NaCl-Lösung (2-mal i.p. gespritzt) oder mit o,9 %iger NaCl-Lösung und nach einer Stunde mit Fe^{2+}-Ionen behandelt wurden. Man sieht deutlich, daß die mit Bleomycin und Fe^{2+}-Ionen behandelten Ratten weniger Ethan abatmeten als die Ratten, denen nur o,9 %ige NaCl-Lösung und Fe^{2+}-Ionen gespritzt worden waren.

Am nächsten Morgen (24 Stunden nach der ersten Injektion) wurden dieselben Ratten ohne weitere Behandlung wieder in die Apparaturen gesetzt und ihre Ethan-Abatmung verfolgt. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 35 zusammengefaßt.

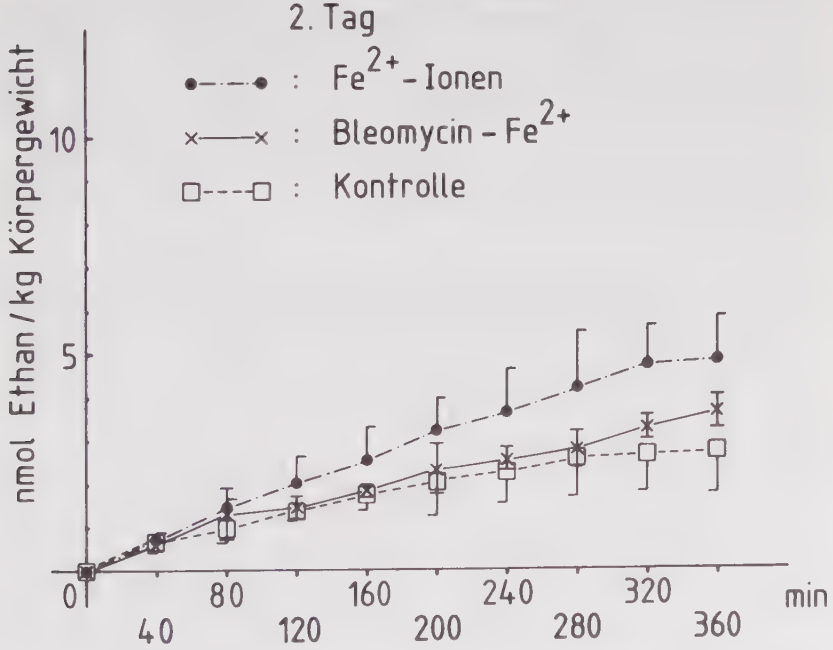


Abb. 35: In vivo-Ethan-Bildung von Ratten nach Behandlung (24 Stunden vorher) mit:
●—·—·—●: Fe^{2+}-Ionen (n=4)
×————×: BLM und Fe^{2+}-Ionen (n=4)
□----□: o,9 %iger NaCl-Lösung (n=4)
Mittelwerte $\pm$ s_x sind dargestellt

Auch hier bildeten die mit Bleomycin und Fe^{2+}-Ionen behandelten Ratten weniger Ethan als die nur mit Fe^{2+}-Ionen behandelten Ratten, wobei die Ethan-Bildung der ersteren bereits auf das Niveau der Kontrollratten abgefallen war.

4.4. Versuche mit Adriamycin

4.4.1. In Lebermikrosomen

Das Antibiotikum Adriamycin (Doxorubicin), das als Zytostatikum in der Tumortherapie klinisch eingesetzt wird, wurde mit Lebermikrosomen inkubiert.
Dazu wurde das Adriamycin-Präparat in KCl-Tris-Puffer gelöst (Zusammensetzung s. 3.1.). Die Konzentrationen der Adriamycin-Stammlösungen waren 4 mg/ml bzw. o,4 mg/ml, o,o4 mg/ml, o,oo4 mg/ml. o,435 ml dieser Stammlösungen wurden 2 min vor dem Start der Reaktion (s. 3.4.) zum jeweiligen Inkubat zugegeben. Die Endkonzentrationen waren $1o^{-4}$M bzw. $1o^{-5}$M, $1o^{-6}$M, $1o^{-7}$M Adriamycin.
Die Abbildungen 36 und 37 zeigen die Chromatogramme der Gasproben aus Inkubationen von Lebermikrosomen mit verschiedenen Konzentrationen von Adriamycin. Ein NADPH-regenerierendes System war außerdem vorhanden. Zum Vergleich sind Inkubationen, die ebenfalls NADPH-regenerierendes System enthielten, ohne Adriamycin gezeigt.
Bei höheren Konzentrationen von Adriamycin ($1o^{-4}$M, Abb. 36 und $1o^{-5}$M, Abb. 37) zeigte sich eine deutliche Verminderung sowohl der Ethan- als auch n-Pentan-Bildung. Mit abnehmender Konzentration von Adriamycin ($1o^{-7}$M, Abb. 37) ist dieser Effekt immer weniger deutlich sichtbar und die Chromatogramme gleichen denen aus Inkubationen mit NADPH-regenerierendem System alleine.

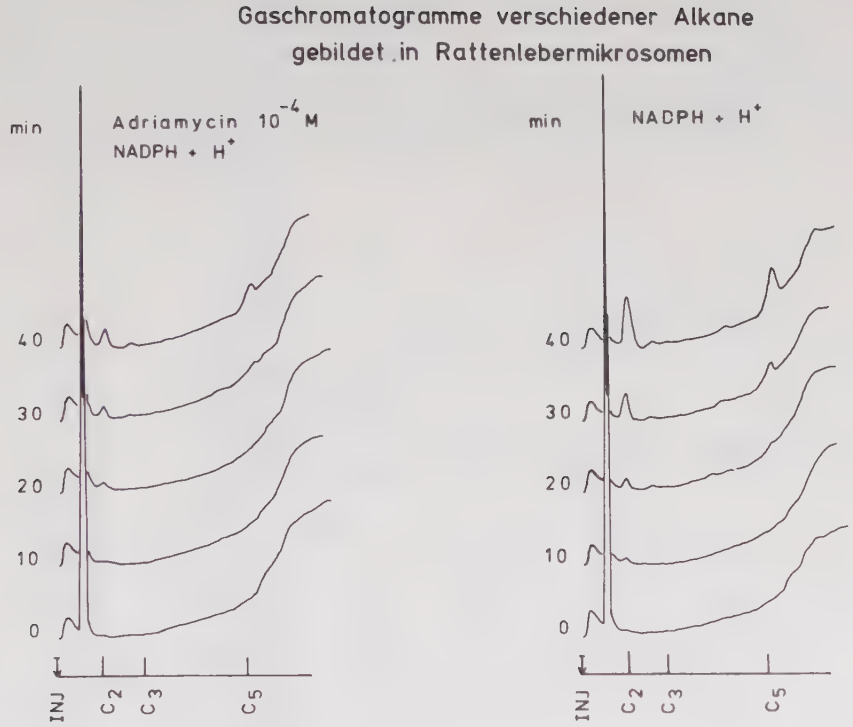
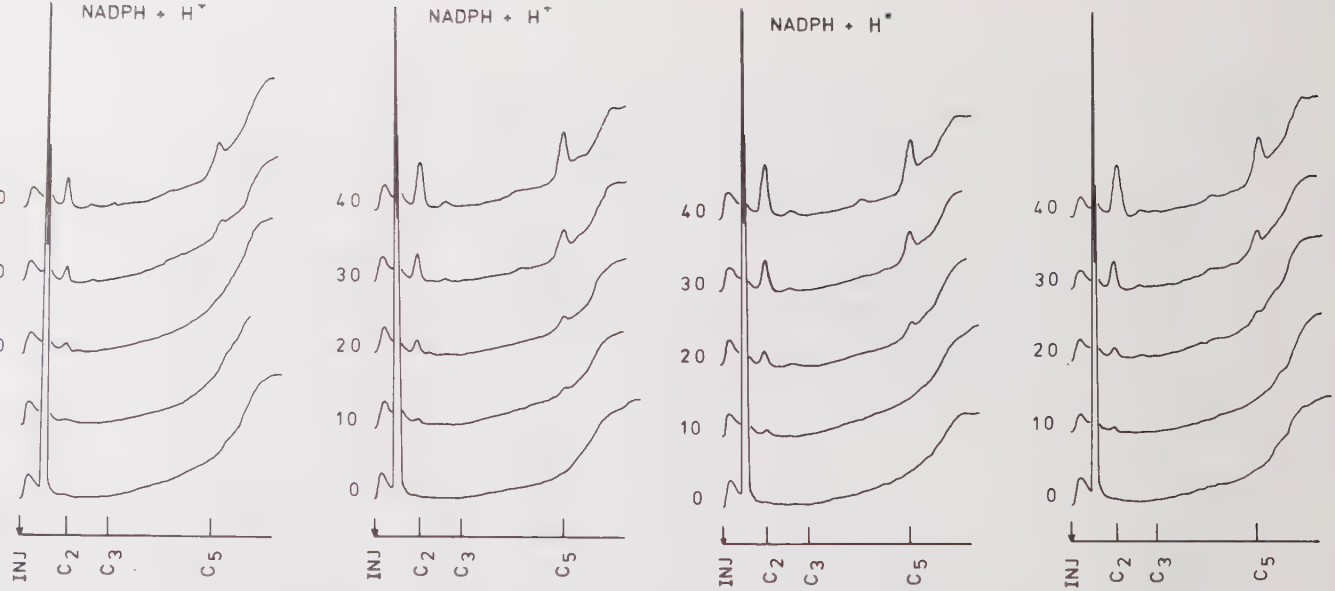


Abb. 36: Aufzeichnung der Original-Chromatogramme der Gasproben nach Inkubation von 10^{-4}M ADR/ml mit Lebermikrosomen und NADPH-reg. System (links) bzw. nach Inkubation mit Lebermikrosomen und NADPH-reg. System aber ohne ADR (rechts). INJ bedeutet Probenaufgabe, C_2 ist Ethan, C_3 ist Propan und C_5 ist n-Pentan. Ein repräsentatives Experiment ist dargestellt.



. 37: Aufzeichnung der Original-Chromatogramme der Gasproben nach Inkubationen von $1o^{-5}$M bzw. $1o^{-6}$M, $1o^{-7}$M ADR mit Lebermikrosomen (1 mg mikrosomales Protein/ml) und NADPH-regenerierendem System (linker Teil) und denselben Inkubationen aber ohne ADR (ganz rechts). INJ bedeutet Probenaufgabe, C_2 ist Ethan, C_3 ist Propan und C_5 ist n-Pentan. Repräsentative Ergebnisse sind dargestellt.

Der Einfluß von Adriamycin auf die Fe^{2+}-Ionen-induzierte Alkan-Bildung wurde in vitro ebenfalls untersucht.
Eine Adriamycin-Endkonzentration im Inkubat von 10^{-4}M bzw. 10^{-5}M Adriamycin wurde gewählt. Zwei Minuten vor dem Start der Reaktion wurden 0,435 ml der entsprechenden Adriamycin-Stammlösung zugegeben. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 38 und 39 dargestellt.

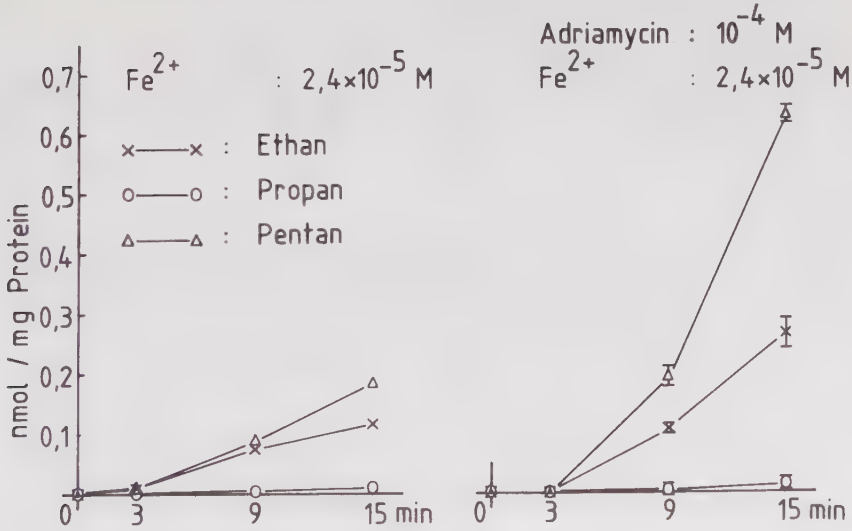


Abb. 38: Alkan-Bildung ausgelöst durch Fe^{2+}-Ionen und ADR (rechts) in Lebermikrosomen (1 mg mikrosomales Protein/ml) in Gegenwart eines NADPH-reg. Systems u. durch Fe^{2+}-Ionen alleine (links).
Rechts sind Mittelwerte $\pm s_x$ (n=3) und links repräsentative Meßwerte dargestellt.

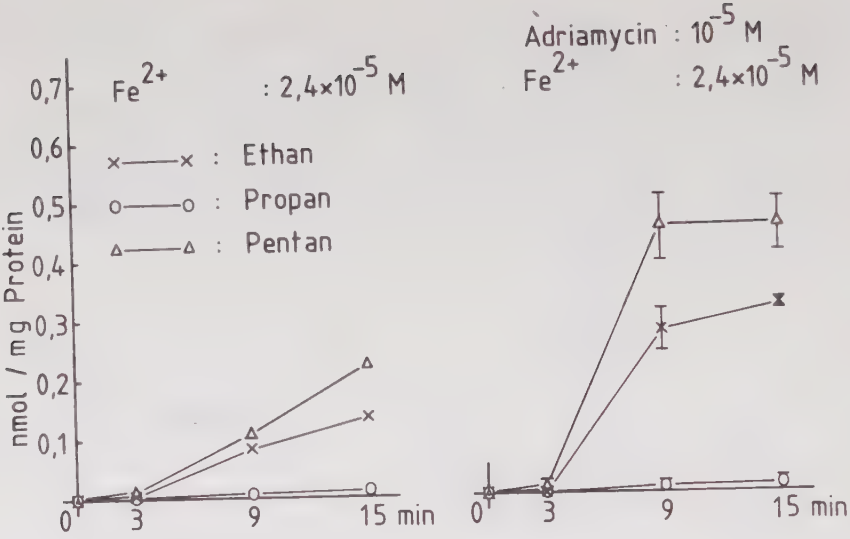


Abb. 39: Alkan-Bildung ausgelöst durch Fe^{2+}-Ionen und ADR (rechts) in Lebermikrosomen (1 mg mikrosomales Protein/ml) in Gegenwart eines NADPH-reg. Systems und durch Fe^{2+}-Ionen alleine (links). Rechts sind Mittelwerte $\pm s_{\bar{x}}$ (n=3) und links repräsentative Meßwerte dargestellt.

Aus den beiden Zeitkurven sieht man deutlich, daß Adriamycin zunächst (bis 3 min) die Fe^{2+}-induzierte Alkan-Bildung inhibierte, danach aber sehr stark stimulierte.

In Tabelle 2 ist der Einfluß verschiedener Faktoren auf die Alkan-Bildung dargestellt. Man sieht, daß die Alkan-Bildung abhängig von NADPH und Fe^{2+}-Ionen ist, und daß sie durch Adriamycin deutlich stimuliert wird, im Vergleich zu der Alkan-Bildung, die nur durch Fe^{2+}-Ionen bedingt ist.

Tabelle 2
Alkan-Bildung in Rattenlebermikrosomen (1 mg mikrosomales Protein/ml) in Gegenwart von Na-Isocitrat und ICDH in Abhängigkeit von ADR, Fe^{2+}-Ionen und $NADP^+$.
Die ADR-Lösung wurde 2 min vor dem Start der Reaktion zugegeben. Die Reaktion wurde durch gleichzeitige Zugabe von $NADP^+$-Lösung und Fe^{2+}-Ionen gestartet.
Wenn ein Bestandteil nicht zugesetzt wurde,wurde stattdessen dieselbe Menge an Puffer zugegeben.
Soweit vorhanden, sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen (s_x) aus einzelnen Versuchen (n = Anzahl) angegeben.

	Zusatz von	nmol Alkan/mg mikrosomales Protein /15 min			n
		Ethan	Propan	n-Pentan	
1	-	-	-	-	2
2	$NADP^+$	-	-	-	2
3	ADR ($1o^{-5}$M)	-	-	-	1
4	ADR ($1o^{-5}$M) und $NADP^+$	-	-	-	1
5	ADR ($1o^{-4}$M)	-	-	-	1
6	ADR ($1o^{-4}$M) und $NADP^+$	-	-	-	1
7	Fe^{2+}-Ionen	o,oo6	-	o,o16	2
8	Fe^{2+}-Ionen und $NADP^+$	o,126	o,oo4	o,199	2
9	ADR ($1o^{-5}$M) u.Fe^{2+}-Ionen	o,oo6	-	o,o15	1
10	ADR ($1o^{-5}$M), Fe^{2+}-Ionen und $NADP^+$	o,316 ± o,oo1	o,oo9 ± o,oo1	o,45o ± o,o44	3
11	ADR ($1o^{-4}$M) u.Fe^{2+}-Ionen	o,oo4	-	o,o11	1
12	ADR ($1o^{-4}$M), Fe^{2+}-Ionen und $NADP^+$	o,266 ± o,o24	o,o1o ± o,oo1	o,627 ± o,oo9	3

Adriamycin und Fe^{3+}-Ionen bilden einen Komplex (molares Verhältnis 1:3), der als Quelamycin^R im Handel ist und sich zur Zeit in der klinischen Prüfung für eine Tumortherapie befindet (s. 2.1.).

o,833 mg Quelamycin-Präparat wurden in 1 ml KCl-Tris-Puffer gelöst. o,18 ml dieser Stammlösung wurden beim Start der Reaktion zur Inkubation zugegeben. Die Endkonzentration war 4 x $1o^{-5}$M Quelamycin.

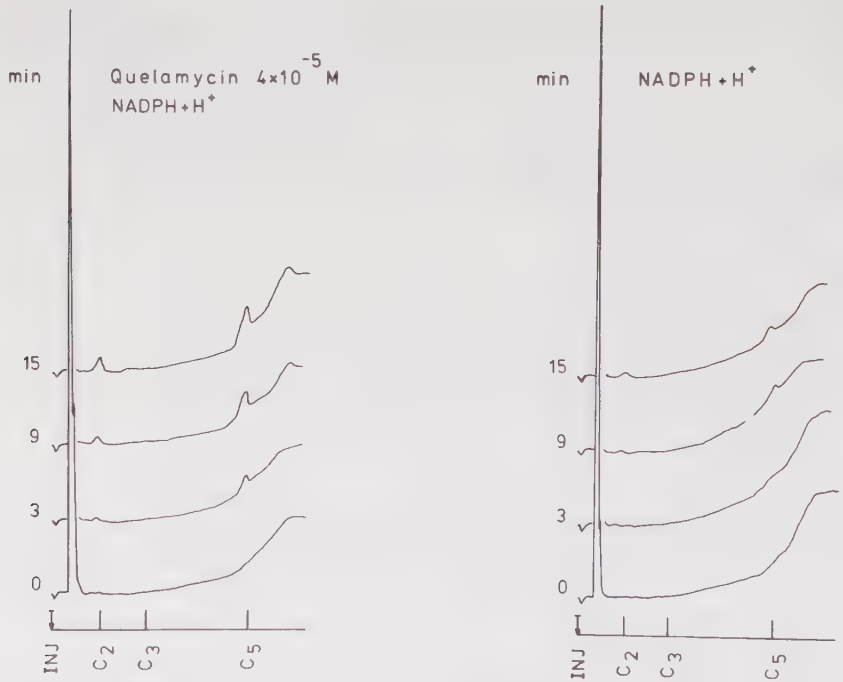


Abb. 4o: Aufzeichnung der Original-Chromatogramme der Gasproben nach Inkubation von Lebermikrosomen (1 mg mikrosomales Protein/ml) und einem NADPH-reg. System mit 4 x $1o^{-5}$M Quelamycin (links)und von denselben Inkubationen ohne Quelamycin (rechts). INJ bedeutet Probenaufgabe, C_2 ist Ethan, C_3 ist Propan und C_5 ist n-Pentan. Repräsentative Ergebnisse sind dargestellt.

Die Abbildung 4o zeigt Chromatogramme der Gasproben von Inkubationen mit Lebermikrosomen und Quelamycin (links) im Vergleich zu Chromatogrammen der Gasproben von Inkubationen ohne Quelamycin (rechts). Sie zeigt weiterhin, daß in Inkubationen mit Quelamycin mehr Ethan und n-Pentan gebildet werden gegenüber derselben Inkubation ohne Quelamycin. Die Zunahme der Alkan-Bildung durch Quelamycin ist gegenüber der durch Fe^{3+}-Ionen induzierte Alkan-Bildung sehr gering (vgl. Abbildungen 4o und 41).

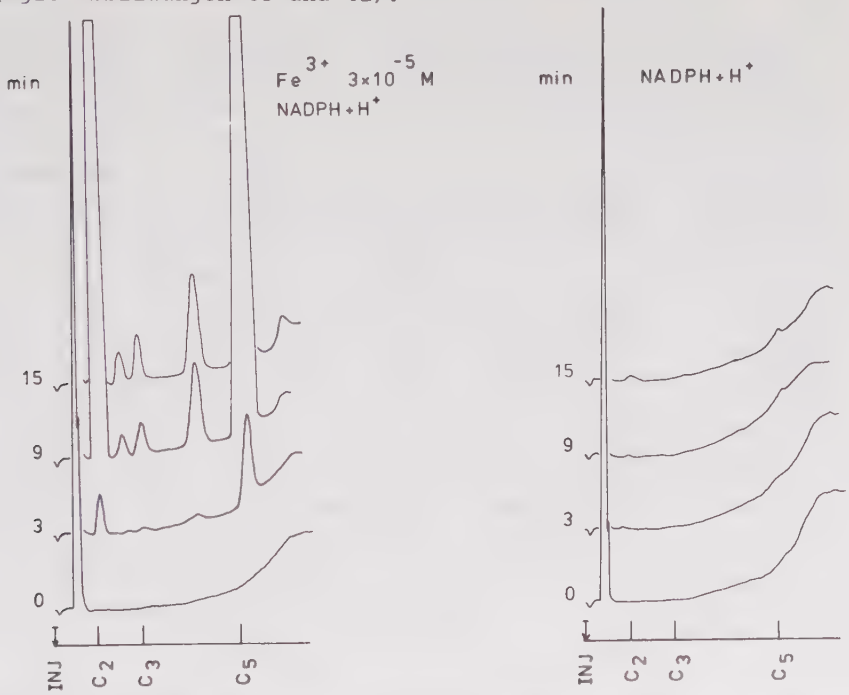


Abb. 41: Aufzeichnung der Original-Chromatogramme der Gasproben nach Inkubation von Lebermikrosomen (1 mg mikrosomales Protein/ml) und einem NADPH-reg. System mit 3 x 10^{-5}M Fe^{3+}-Ionen (links) und von denselben Inkubationen ohne Fe^{3+}-Ionen.
INJ bedeutet Probenaufgabe, C_2 ist Ethan, C_3 ist Propan und C_5 ist n-Pentan.
Repräsentative Ergebnisse sind dargestellt

4.4.2. In vivo-Versuche

Zur Alkan-Bestimmung bei Ratten in vivo wurden spezielle Apparaturen verwendet (s. 3.6. und 3.7.).
Das Adriamycin-Präparat wurde in o,9 %iger NaCl-Lösung gelöst. Die Konzentration der Stammlösung wurde so gewählt, daß das den Tieren gespritzte Volumen der Adriamycin-Lösung o,4 ml bis 1,o ml betrug.

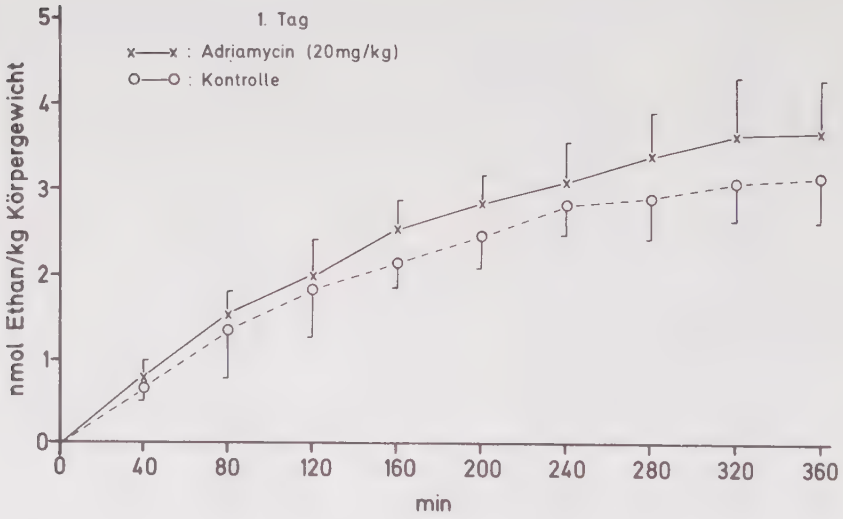


Abb. 42: Ethan-Bildung von Ratten unmittelbar nach Behandlung mit:
x——x : 2o mg ADR/kg KG i.p. (n=4)
o----o : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=4)
Mittelwerte $\pm$ s_x sind angegeben.

Abbildung 42 zeigt die Zeitkurve der Ethan-Bildung von Ratten unmittelbar nach i.p.-Behandlung mit 2o mg Adriamycin/kg Körpergewicht während einer 6-stündigen Meßperiode. Als Kontrollen wurden Tiere mit einer äquivalenten Menge o,9 %iger NaCl-Lösung gespritzt.
Obwohl die Mittelwerte der Ethan-Mengen von den Tieren, die mit 2o mg Adriamycin/kg behandelt worden waren, höher als die von den Kontrolltieren lagen, ergab sich bei der statistischen Auswertung kein signifikanter Unterschied.

Am nächsten und übernächsten Tag wurden dieselben Tiere ohne weitere Behandlung erneut 6 Stunden lang auf ihre Ethan-Abatmung untersucht.
Abbildung 43 zeigt, daß sowohl am 2. Tag (24 Stunden nach Behandlung) als auch am 3. Tag (48 Stunden nach Behandlung) keine Erhöhung der Ethan-Bildung bei den Tieren auftrat, die mit Adriamycin behandelt worden waren, im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren.
Da bei der Dosis von 2o mg Adriamycin/kg Körpergewicht keine zusätzliche Ethan-Bildung beobachtet werden konnte, wurden Versuche mit hoher Dosierung durchgeführt.

Abbildung 44 zeigt die Zeitkurven der Ethan-Bildung von Tieren unmittelbar nach i.p.-Behandlung mit 45 mg Adriamycin/kg Körpergewicht während einer 6-stündigen Meßperiode. Als Kontrollen wurden Tiere mit einer äquivalenten Menge o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. behandelt. Die beiden Kurvenverläufe der Ethan-Bildung sind fast identisch.

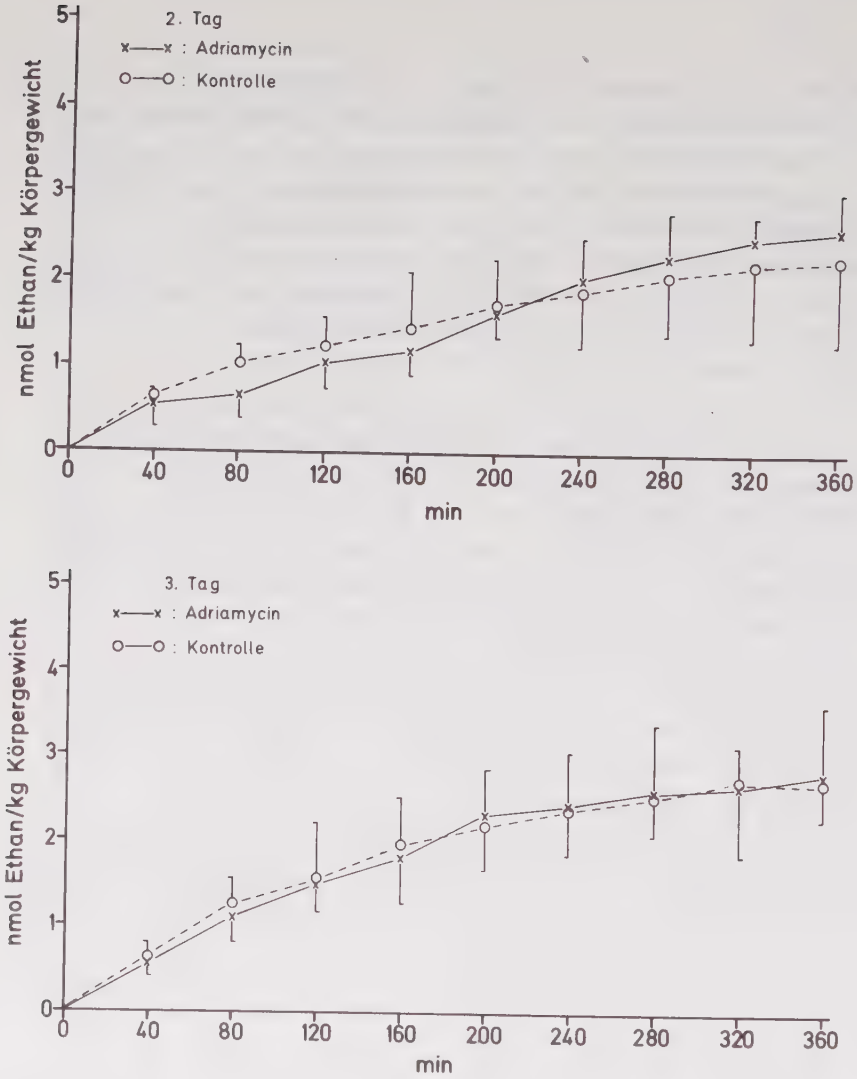


Abb. 43: Ethan-Bildung von Ratten am 2. und 3. Tag nach Behandlung (1. Tag) mit:
x——x : 2o mg ADR/kg KG i.p. (n=4)
O----O : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=4)
Die Meßperiode begann (t=o min) 24 Std. (2.Tag) bzw. 48 Std. (3. Tag) nach Behandlung.
Mittelwerte $\pm$ s_x sind angegeben.

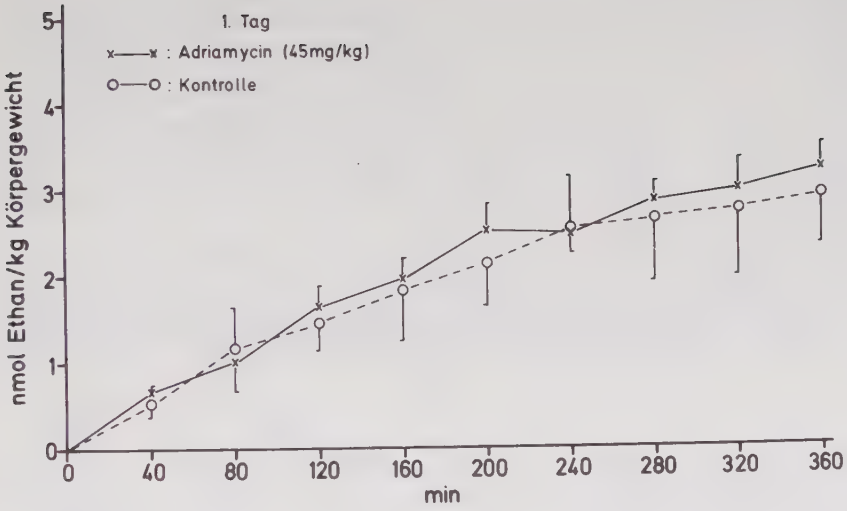
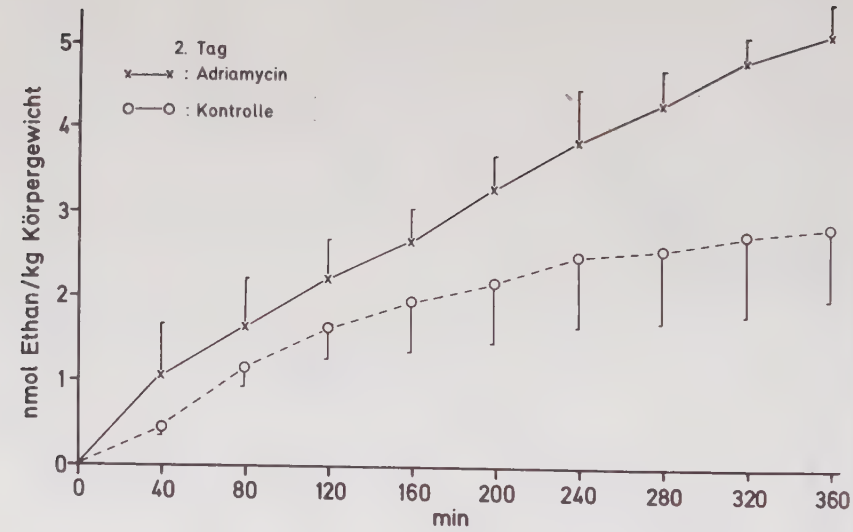


Abb. 44: Ethan-Bildung von Ratten unmittelbar nach Behandlung (1. Tag) mit:
x——x : 45 mg ADR/kg KG i.p. (n=6)
O----O : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=4)
Mittelwerte $\pm$ s_x sind angegeben

Am nächsten und übernächsten Tag wurden dieselben Tiere ohne weitere Behandlung erneut 6 Stunden lang auf ihre Ethan-Abatmung untersucht. Abbildung 45 zeigt, dass es am 2. Tag (24 Stunden nach Behandlung) zu einer Erhöhung der Ethan-Bildung bei Adriamycin-behandelten Tieren kommt, im Vergleich zu den Kontrolltieren.



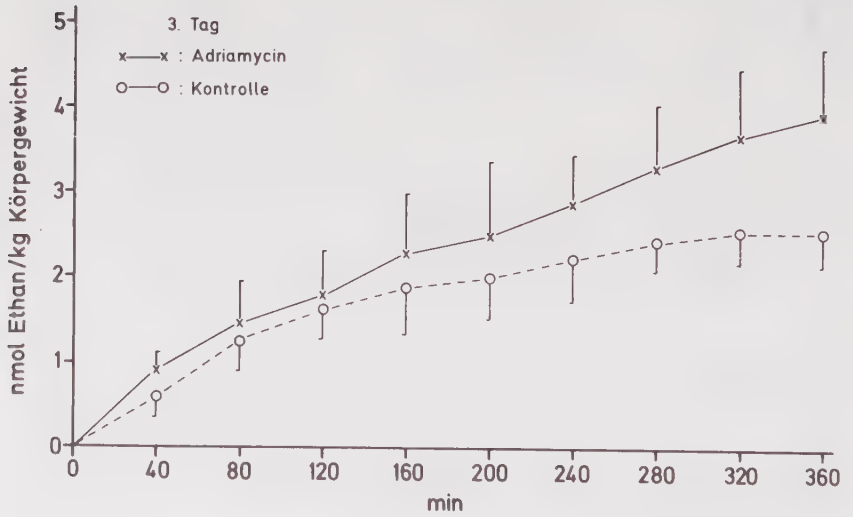


Abb. 45: Ethan-Bildung von Ratten am 2. und 3. Tag nach Behandlung (1. Tag) mit:
x——x : 45 mg ADR/kg KG i.p. (n=4)
O----O : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=4)
Die Meßperiode begann (t = o min) 24 Std. (2. Tag) bzw. 48 Std. (3. Tag) nach Behandlung. Mittelwerte $\pm$ s_x sind angegeben.

Am 3. Tag (48 Stunden nach Behandlung) unterscheiden sich die beiden Kurvenverläufe nur noch geringfügig. Diese Unterschiede sind nur schwach signifikant.
Besonders hervorzuheben ist jedoch, daß von den 6 Tieren, die mit 45 mg Adriamycin/kg Körpergewicht behandelt worden waren, 2 innerhalb von 2 Tagen starben. Am 4. Tag (1 Tag nach der letzten Messung) waren sogar nur noch 3 Tiere am Leben.

Abbildung 46 zeigt die Zeitkurven der Ethan-Bildung von Tieren unmittelbar nach i.p.-Behandlung mit 65 mg Adriamycin/kg Körpergewicht während einer 6-stündigen Meßperiode.

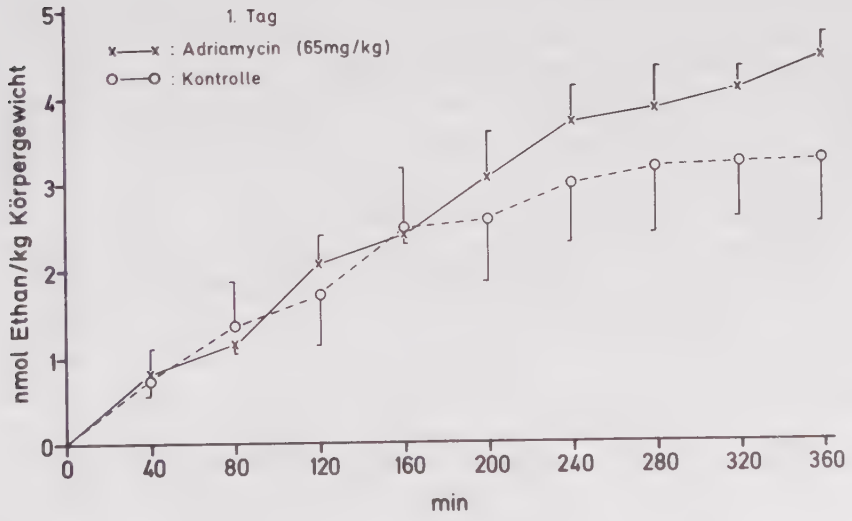


Abb. 46: Ethan-Bildung von Ratten unmittelbar nach Behandlung (1. Tag) mit:
x——x : 65 mg ADR/kg KG i.p. (n=3)
o----o : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=3)
Mittelwerte $\pm$ s_x sind angegeben.

Als Kontrolle wurden Tiere mit einer äquivalenten Menge o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. behandelt. Bis ca. 3 Stunden verlaufen die beiden Kurven fast gleich. Erst danach unterscheiden sich die Mittelwerte von Kontrolltieren und behandelten Tieren.
Alle mit 65 mg Adriamycin/kg Körpergewicht behandelten Tiere waren 24 Stunden nach der Behandlung gestorben.

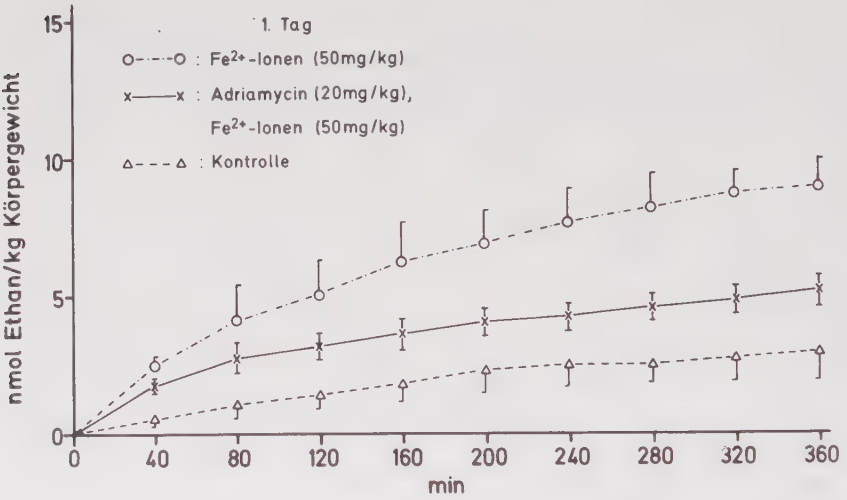


Abb. 47: Ethan-Bildung von Ratten unmittelbar nach Behandlung (1. Tag) mit:
x———x: 2o mg ADR/kg KG i.p. und 1 Stunde danach 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=8)
o—·—·—o: o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. und 1 Stunde danach 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=4)
Δ-----Δ: zweimal o,9 %ige NaCl-Lösung i.p. im Abstand von 1 Stunde (n=4)
Mittelwerte $\pm$ $s_{\bar{x}}$ sind angegeben

Der Einfluß von Adriamycin auf die durch Fe^{2+}-Ionen induzierte Ethan-Bildung wurde auch in vivo untersucht. Die Tiere wurden zunächst mit 2o mg Adriamycin/kg Körpergewicht i.p. behandelt. Nach 1 Stunde wurden 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht gespritzt (i.p.).

Unmittelbar danach wurden diese Tiere in spezielle Apparaturen (s. Abb. 2) gesetzt und die Ethan-Abatmung gemessen. Als Vergleichsgruppe wurden Tiere verwendet, die zuerst mit o,9 %iger NaCl-Lösung und 1 Stunde später mit 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht i.p. behandelt wurden. Als Kontrolle wurden Tiere eingesetzt, die zweimal eine o,9 %ige NaCl-Lösung i.p. im Abstand von 1 Stunde gespritzt bekamen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 47 dargestellt, die zeigt, daß die mit Adriamycin und Fe^{2+}-Ionen behandelten Tiere während dieser ersten Meßperiode weniger Ethan abatmeten als die nur mit Fe^{2+}-Ionen behandelten. Die Zeitkurve der Ethan-Bildung von Tieren, die nur mit NaCl-Lösung behandelt worden waren, verlief noch niedriger.

An den nächsten Tagen wurden die Tiere ohne weitere Behandlung erneut in die Apparaturen gesetzt und die Ethan-Abatmung in einer 6-stündigen Meßperiode untersucht.

Die Abbildung 48 zeigt, dass die Tiere, die mit Adriamycin und Fe^{2+}-Ionen behandelt worden waren, sowohl am 2. Tag (24 Stunden nach der Behandlung), als auch am 3. Tag (48 Stunden nach der Behandlung) sehr hohe Ethan-Mengen bildeten im Verhältnis zu den Tieren, die entweder nur mit NaCl-Lösung oder mit NaCl-Lösung und Fe^{2+}-Ionen behandelt worden waren.

Zwei der mit Adriamycin und Fe^{2+}-Ionen behandelten Tiere starben am Behandlungstag (nach 6-stündiger Meßperiode), zwei Tiere starben am 2. Tag (24 Stunden nach Behandlung) (s. Tierzahlen bei den Abbildungen).

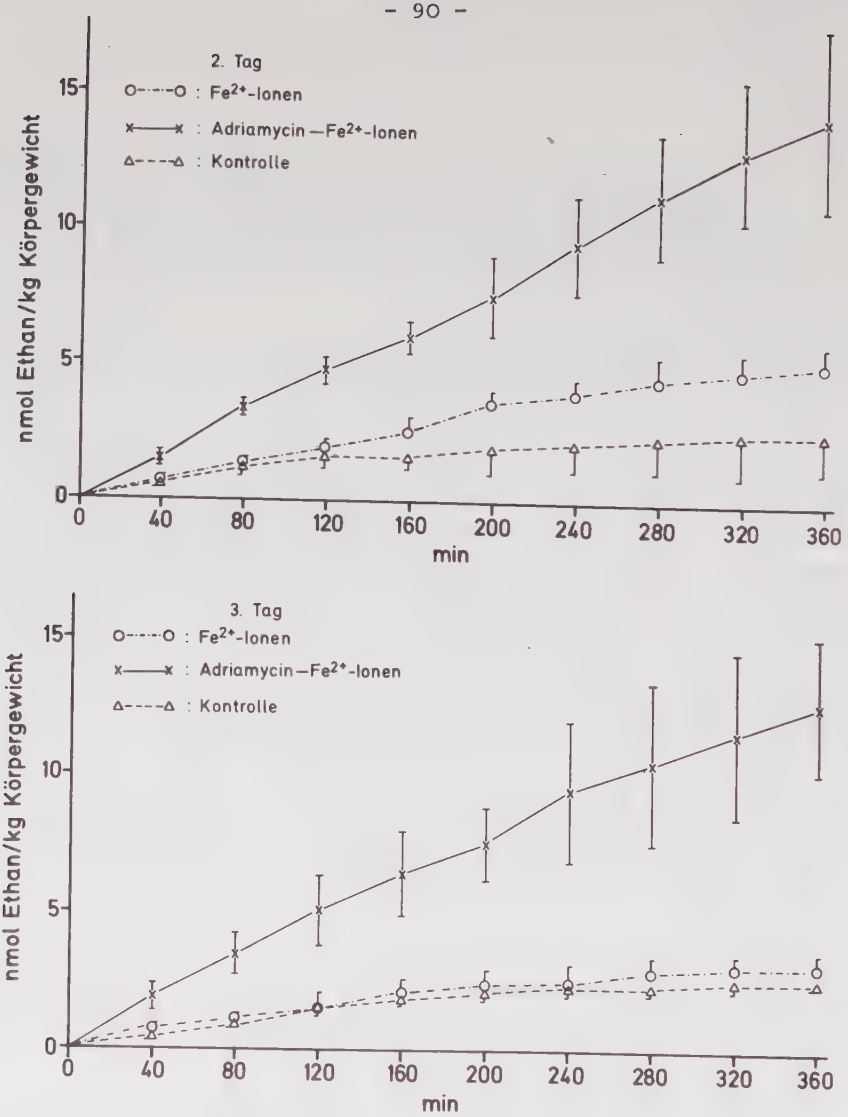


Abb. 48: Ethan-Bildung am 2. und 3. Tag von Ratten nach Behandlung (1. Tag) mit:
×———×: 2o mg ADR/kg KG i.p. und 1 Stunde danach 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (2.Tag:n=6; 3.Tag:n=4)
O—·—O: o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. und 1 Stunde danach 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p.(n=4)
Δ----Δ: zweimal o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. im Abstand von 1 Stunde (n=4)
Die Meßperiode begann (t=O min) 24 Std. (2.Tag) bzw. 48 Std. (3.Tag) nach der ersten Behandlung. Mittelwerte $\pm$ s_x sind angegeben.

Die Ethan-Bildung der Fe^{2+}-Kontrolltiere normalisierte sich dagegen sehr schnell. Es starben auch keine Tiere bei dieser Versuchsgruppe.
Am 3. Tag waren die Zeitkurven der Ethan-Bildung der Lösungsmittel-Kontrolltiere und der Fe^{2+}-Kontrolltiere bereits gleich. Am 4. Tag dieser Versuchsserie (72 Stunden nach Behandlung) waren nur noch 2 von 8 Tieren, die am 1. Tag mit Adriamycin und Fe^{2+}-Ionen behandelt worden waren, am Leben. In Abbildung 49 wurde der Mittelwert der Ethan-Bildung dieser Tiere im Vergleich zu der Ethan-Bildung der beiden Kontrollgruppen dargestellt.

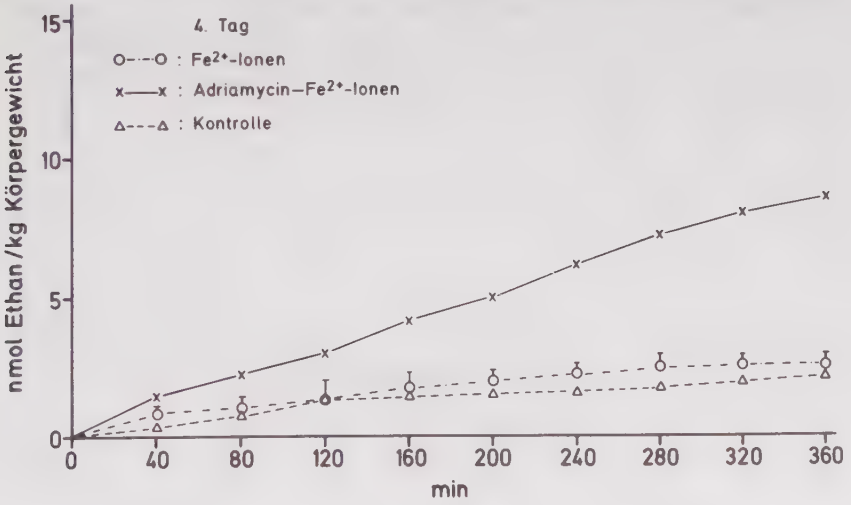


Abb. 49: Ethan-Bildung am 4. Tag von Ratten nach Behandlung (1. Tag) mit:
x————x : 2o mg ADR/kg KG i.p. und 1 Stunde danach 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=2)
O—·—·—O : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p.und 1 Stunde danach 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p.(n=4)
Δ-----Δ : zweimal o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. im Abstand von 1 Stunde (n=4)
Die Meßperiode begann (t = O) 72 Std. nach der ersten Behandlung. Mittelwerte von je 2 Tieren sind angegeben.

Diese Abbildung zeigt, daß diese Tiere immer noch relativ große Ethan-Mengen abatmeten im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen.
Nach 6 Tagen waren alle mit Adriamycin und Fe^{2+}-Ionen behandelten Tiere gestorben.
Der zeitlich verzögerte Ethan-Anstieg nach Adriamycin und Fe^{2+}-Ionen könnte durch eine verzögerte Bildung des Adriamycin-Eisen-Komplexes bedingt sein, der dann als eigentlicher Initiator der erhöhten Ethan-Bildung anzusehen wäre.
Deshalb wurde der Einfluß des Adriamycin-Eisen-Komplexes (Quelamycin^R) auf die Ethan-Bildung untersucht.
Dazu wurde entweder Quelamycin verwendet, das als Handelspräparat vorlag oder ein eigenes Präparat, das aus Adriamycin und $FeCl_3$ hergestellt wurde (s. 2.1.).

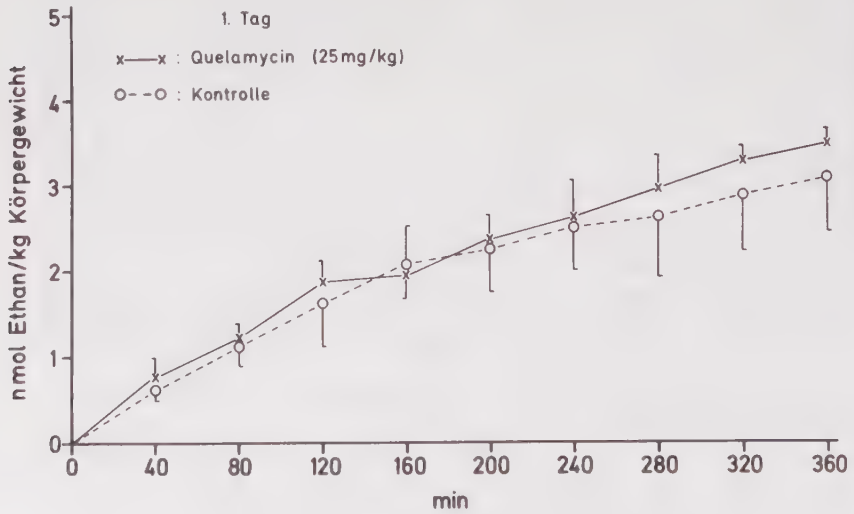


Abb. 50: Ethan-Bildung von Ratten unmittelbar nach Behandlung mit:
x——x : 25 mg Quelamycin/kg KG i.p. (n=4)
o----o : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=4)
Mittelwerte $\pm$ s_x sind angegeben

Die Tiere wurden mit 25 mg Quelamycin/kg Körpergewicht (entsprechend 2o mg Adriamycin/kg KG) i.p. gespritzt. Unmittelbar danach wurden sie in die Apparaturen gesetzt und auf ihre Ethan-Abatmung untersucht. Als Kontrollen wurden Tiere mit o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. gespritzt. Abbildung 5o zeigt die Zeitkurven der Ethan-Bildung dieser Versuche. Innerhalb von 6 Stunden bildeten die Quelamycin-behandelten Tiere genausoviel Ethan wie die Kontrolltiere.
Am nächsten Morgen wurden dieselben Tiere ohne weitere Behandlung erneut in die Apparaturen gesetzt und auf ihre Ethan-Abatmung untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 dargestellt.

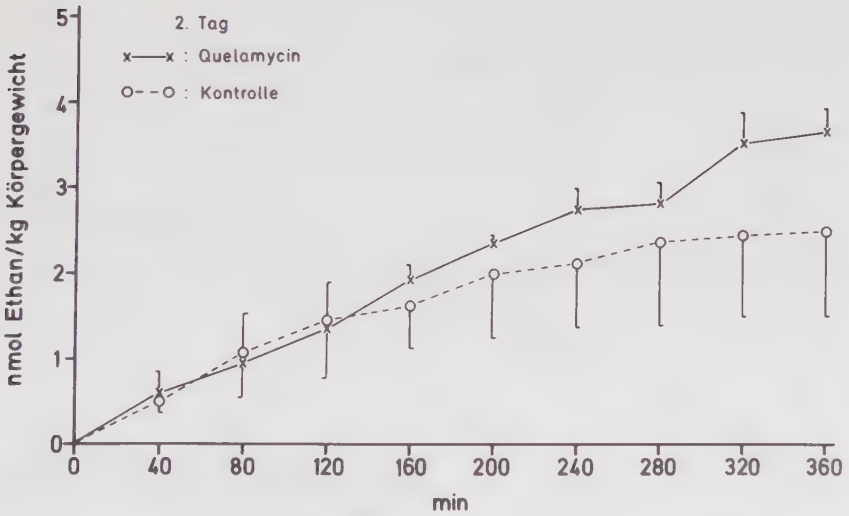


Abb. 51: Ethan-Bildung von Ratten am 2. Tag nach der Behandlung (am 1. Tag) mit:
x——x : 25 mg Quelamycin/kg KG i.p. (n=4)
o----o : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=4)
Die Meßperiode begann (t=0 min) 24 Std. nach der Behandlung. Mittelwerte $\pm$ s_x sind angegeben.

Die mit Quelamycin behandelten Tiere zeigten erst am Ende der 6-stündigen Meßperiode eine etwas höhere Ethan-Bildung, die allerdings statistisch nicht signifikant war.
Es wurden zusätzlich weitere Tiere mit 55 mg Quelamycin/kg Körpergewicht i.p. gespritzt und auf ihre Ethan-Abatmung untersucht. Die Quelamycin-Dosis entspricht 45 mg Adriamycin/kg Körpergewicht. Als Kontrollen wurden Tiere mit einer äquivalenten Menge von o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. gespritzt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 dargestellt. Die Mittelwerte der Ethan-Mengen, die von den mit Quelamycin behandelten Tieren gebildet wurden, waren genau gleich hoch wie die von den Kontrollen. Lediglich eine relativ große Streuung der Einzelwerte wurde beobachtet.

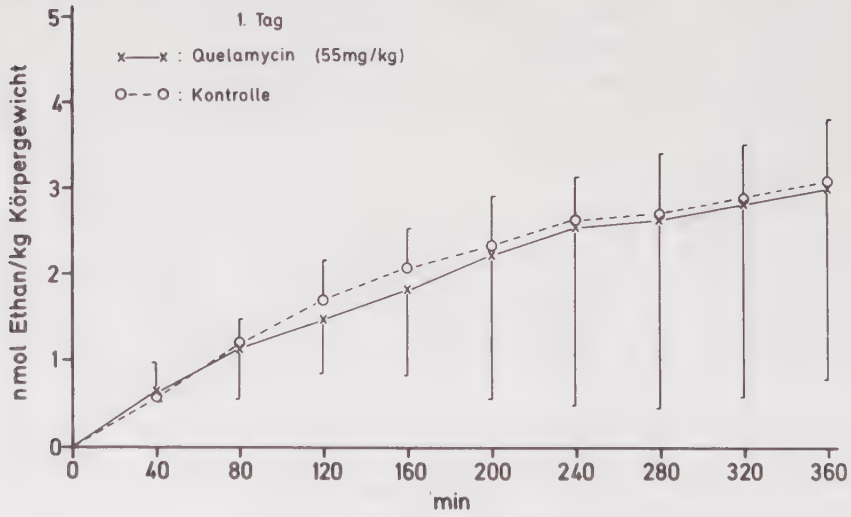


Abb. 52: Ethan-Bildung von Ratten unmittelbar nach Behandlung mit:
x——x : 55 mg Quelamycin/kg KG i.p. (n=5)
O----O : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=5)
Mittelwerte $\pm$ s_x sind angegeben

Am nächsten Morgen (24 Stunden nach Behandlung) wurde die Ethan-Bildung dieser Tiere erneut untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 53 dargestellt. Auch hier wurde kein Unterschied zwischen den beiden Kurvenverläufen der Ethan-Bildung von Quelamycin-behandelten Tieren und von Kontrolltieren beobachtet.

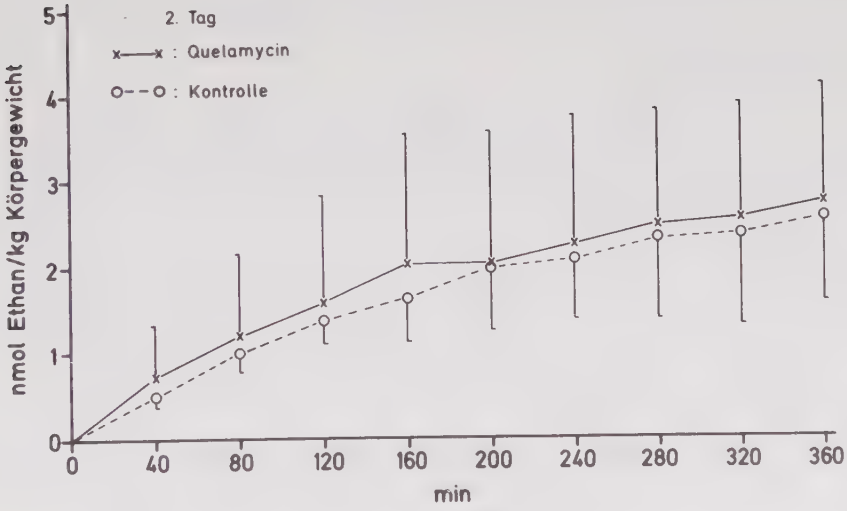


Abb. 53: Ethan-Bildung von Ratten am 2. Tag nach Behandlung (1. Tag) mit:
x——x : 55 mg Quelamycin/kg KG i.p. (n=5)
O----O : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=5)
Die Meßperiode begann (t = O min) 24 Std. nach Behandlung. Mittelwerte $\pm s_x$ sind angegeben.

Da bei den Versuchen mit Adriamycin und Fe^{2+}-Ionen im Abstand von einer Stunde eine verstärkte Ethan-Bildung erst nach 2 Tagen beobachtet werden konnte, besteht die Möglichkeit, daß Adriamycin zunächst eine Schädigung verursacht, die zu einer verstärkten peroxidierenden Wirkung der Fe^{2+}-Ionen, die dann noch im Organismus vorhanden sind, führen könnte. Die erhöhte Ethan-Bildung könnte auch eine Folge der Komplex-Bildung von Adriamycin und Fe^{2+}-Ionen im Körper sein, wodurch die Fe^{2+}-Ionen danach verzögert freigegeben würden. Dies würde zu einer späteren Wirkung der Fe^{2+}-Ionen führen.
Zur Klärung dieser Fragen, wurden die beiden Komponenten zeitlich stärker versetzt gespritzt. Die Tiere wurden zuerst mit 2o mg Adriamycin/kg Körpergewicht und erst 24 Stunden später mit 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht i.p. behandelt. Unmittelbar danach wurden sie in die Apparaturen gesetzt und auf ihre Ethan-Abatmung untersucht. Als Kontrollen dienten Tiere, die zuerst mit o,9 %iger NaCl-Lösung und nach 24 Stunden entweder mit 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht oder noch einmal mit o,9 %iger NaCl-Lösung gespritzt worden waren.
Abbildung 54 zeigt die Zeitkurven der Ethan-Bildung von Tieren, die sowohl mit Adriamycin als auch mit Fe^{2+}-Ionen im Abstand von 24 Stunden behandelt worden waren, und die entsprechenden Kurven der Kontrollgruppen. Tiere, die zuerst mit o,9 %iger NaCl-Lösung und nach 24 Stunden mit Fe^{2+}-Ionen behandelt worden waren, atmeten genausoviel Ethan ab, wie die Tiere, die Adriamycin und Fe^{2+}-Ionen gespritzt bekamen.

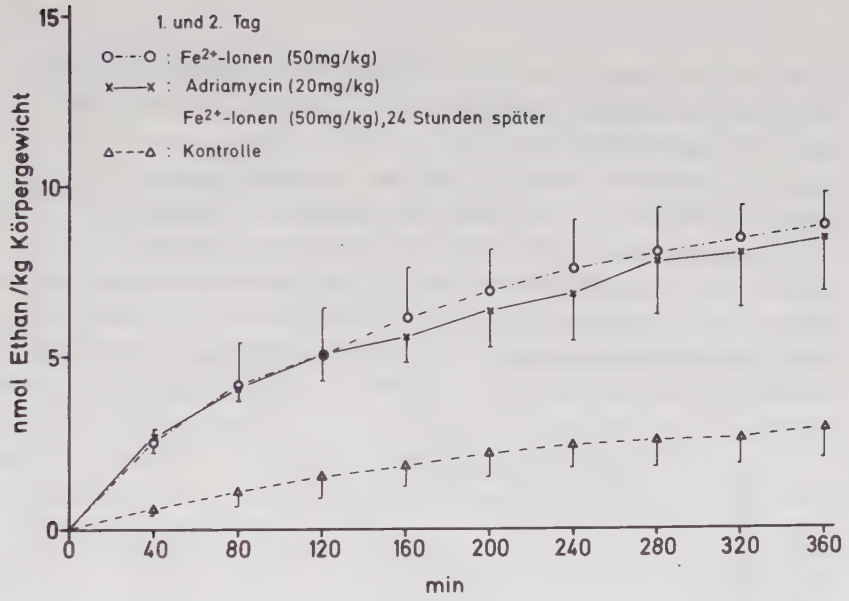


Abb. 54: Ethan-Bildung von Ratten unmittelbar nach Behandlung mit:

x————x : 2o mg ADR/kg KG i.p. und 24 Stunden später mit 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=7)

O—·—·—O : o,9 %iger NaCl-Lösung und 24 Stunden später mit 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=4)

Δ- - - -Δ : zweimal o,9 %iger NaCl-Lösung im Abstand von 24 Stunden i.p. (n=4)

Die Meßperiode begann (t = O min) 24 Std. nach der ersten und unmittelbar nach der zweiten Behandlung. Mittelwerte $\pm$ s_x sind angegeben.

Obwohl bei diesen Versuchen keine Erhöhung der Ethan-Bildung beobachtet wurde, starben nach dieser Behandlung mit Adriamycin und Fe^{2+}-Ionen mehrere Tiere. Von 12 Tieren, die behandelt worden waren, starben bereits 5 vor dem Ende der 6-stündigen Meßperiode (nicht in Abbildung 54 dargestellt). Am nächsten Morgen lebten von den restlichen Versuchstieren nur noch 3.

Diese wurden noch einmal auf ihre Ethan-Bildung untersucht und zwar 48 Stunden nach der ersten bzw. 24 Stunden nach der zweiten Behandlung.
Die mit Adriamycin und Fe^{2+}-Ionen behandelten Tiere bildeten etwas mehr Ethan als die beiden Kontrollgruppen.
Der Unterschied zwischen den mit Adriamycin und Fe^{2+}-Ionen behandelten Tieren und den nur mit Fe^{2+}-Ionen behandelten Tieren ist jedoch relativ klein (Abb. 55).
Alle mit Adriamycin und Fe^{2+}-Ionen behandelten Tiere starben innerhalb der nächsten 24 Stunden.

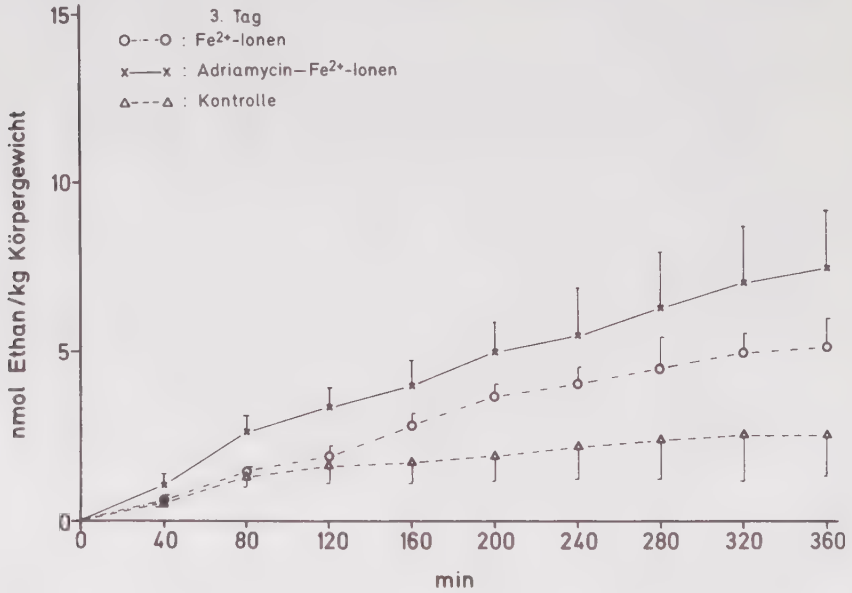


Abb. 55: Ethan-Bildung von Ratten am 3. Tag nach Behandlung mit:
x———x : 2o mg ADR/kg KG i.p. am 1.Tag und 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. am 2.Tag (n=3)
O— — —O : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. am 1.Tag und 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p.am 2.Tag(n=4)
Δ-----Δ : zweimal o,9 %iger NaCl-Lösung im Abstand von 24 Stunden i.p. (n=4)
Die Meßperiode begann (t = O min) 48 Std. nach der ersten und 24 Std. nach der zweiten Behandlung.
Mittelwerte $\pm$ s_x sind angegeben.

4.5. Versuche mit Paraquat in vivo

Das Herbizid Paraquat (N,N'-Dimethyl-4,4'-dipyridyldihydrochlorid), dessen Toxizität über eine Lipidperoxidation erklärbar sein könnte, wurde im Ganztier-Versuch daraufhin getestet, ob es eine Ethan-Bildung auslösen kann.
Die Tiere wurden mit 5o mg Paraquat/kg Körpergewicht i.p. behandelt (akute Behandlung). Dazu wurde Paraquat in o,9 %iger NaCl-Lösung gelöst und den Tieren i.p. gespritzt. Das Volumen, das pro Tier gespritzt wurde, lag zwischen o,7 ml und 1,5 ml für Ratten und zwischen o,5 und 1,o ml für Mäuse. Als Kontrollen wurden Tiere mit einer äquivalenten Menge einer o,9 %igen NaCl-Lösung i.p. behandelt. Unmittelbar nach der Behandlung wurden die Tiere in die Apparatur gesetzt und auf ihre Ethan-Abatmung untersucht.
In Abbildung 56 sind die Ergebnisse der Versuche mit Ratten dargestellt. Der zeitliche Verlauf der Ethan-Bildung Paraquat-behandelter Tiere unterscheidet sich sehr wenig von dem der Kontrolltiere. Einige der Paraquat-behandelten Ratten starben während des Versuchs, einige kurz danach. 24 Stunden nach der Behandlung waren alle Tiere, die mit Paraquat behandelt worden waren, gestorben. Deshalb konnte die Ethan-Bildung nicht weiter verfolgt werden.

Bei den Versuchen mit Mäusen wurden je 3 Mäuse nach der Paraquat-Behandlung zusammen in eine Apparatur gesetzt. Jeder Ethan-Meßwert war also der Mittelwert der Ethan-Menge, die diese 3 Mäuse gemeinsam bildeten. Die Abbildung 57 zeigt, daß sowohl NMRI- als auch C3H-Mäuse, die mit Paraquat behandelt worden waren, mehr Ethan bildeten als die Kontrolltiere. Die Werte sind aber nur schwach statistisch signifikant.
Alle Mäuse, die mit Paraquat behandelt worden waren, starben innerhalb von 48 Stunden nach Behandlung.

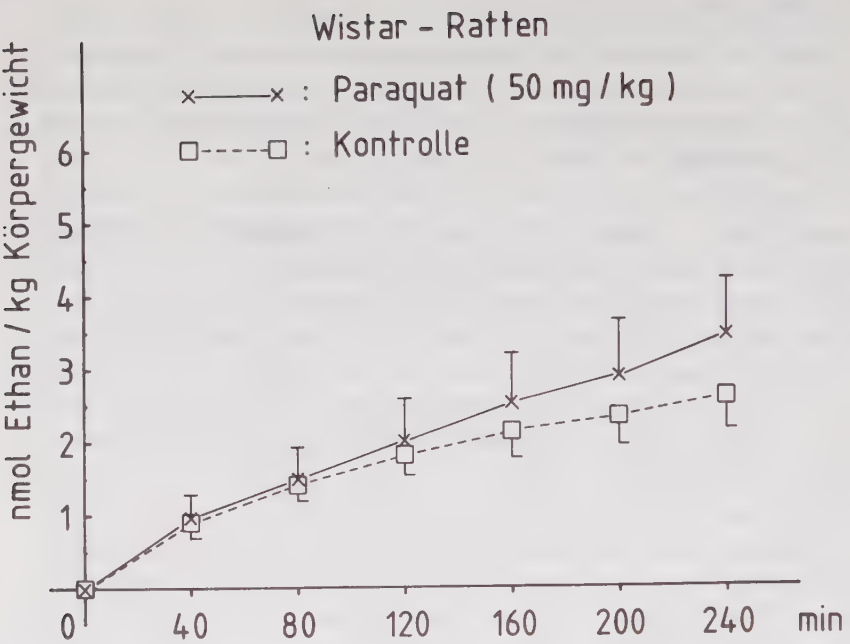
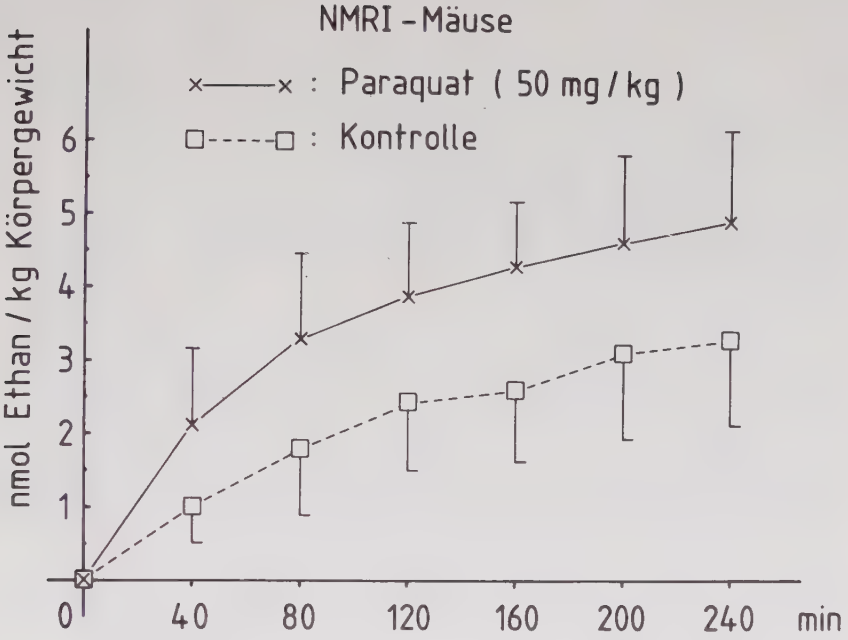
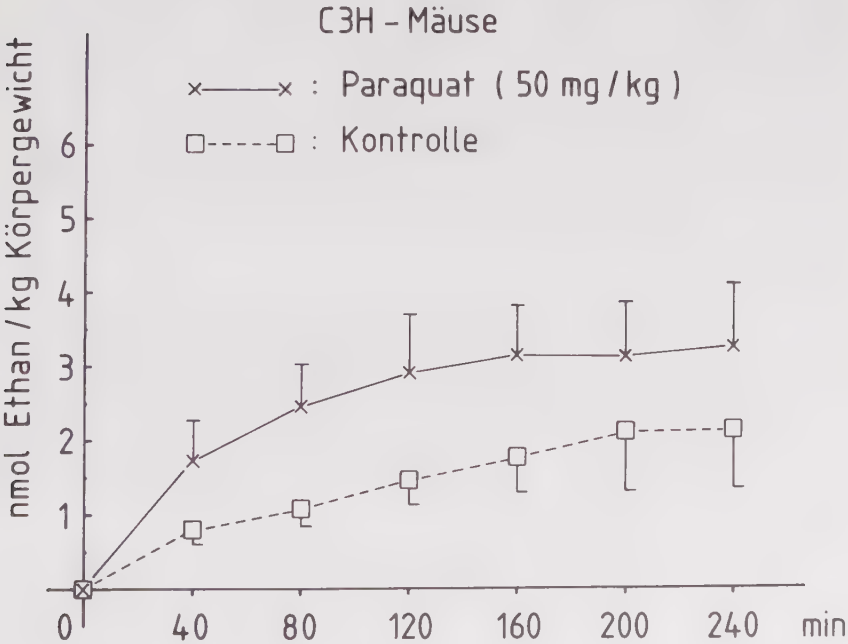


Abb. 56: Ethan-Bildung von Ratten (n=9) nach Behandlung mit:
x——x : 5o mg Paraquat/kg KG i.p.
□----□ : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p.
Mittelwerte $\pm$ s_x sind angegeben

Abb. 57: Ethan-Bildung von Mäusen verschiedener Stämme nach Behandlung mit:
x——x : 5o mg Paraquat/kg KG i.p.
□----□ : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p.
Mittelwerte $\pm$ s_x der Meßwerte (n=6) sind angegeben, wobei jeder Meßwert der Mittelwert der Ethan-Bildung von 3 Mäusen war. P $\approx$ o,o5 bei 24o min


NMRI - Mäuse
× —— × : Paraquat (50 mg / kg)
□ - - - - □ : Kontrolle
nmol Ethan / kg Körpergewicht
0
1
2
3
4
5
6
0
40
80
120
160
200
240
min


C3H - Mäuse
× —— × : Paraquat (50 mg / kg)
□ - - - - □ : Kontrolle
nmol Ethan / kg Körpergewicht
0
1
2
3
4
5
6
0
40
80
120
160
200
240
min

4.6. CCl_4-induzierte Lipidperoxidation

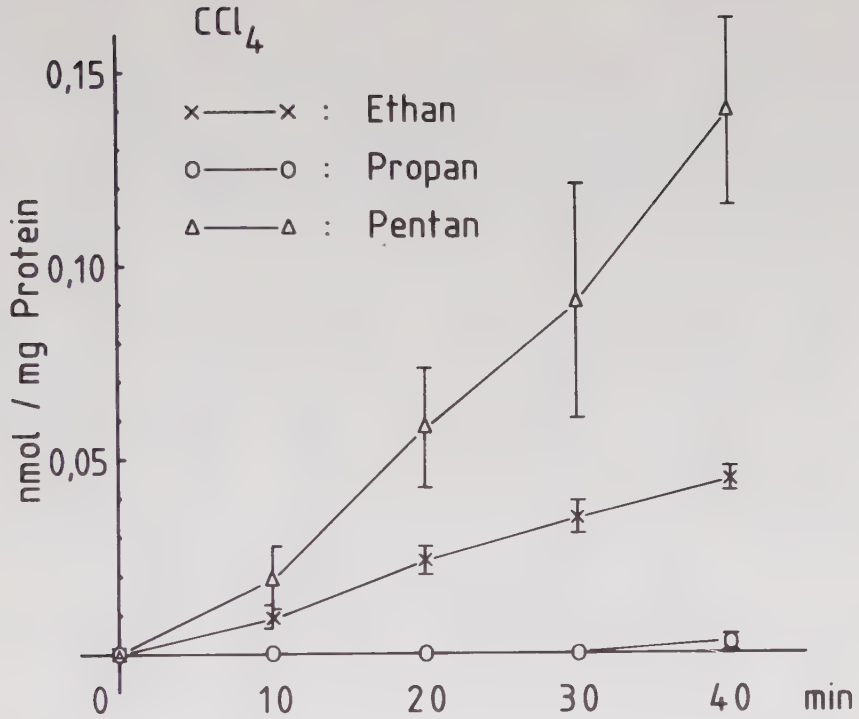
4.6.1. In Lebermikrosomen

Der als Lebergift bekannte Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) wurde in Lebermikrosomen daraufhin untersucht, ob er eine Alkan-Bildung auslösen kann.
Die Inkubationen wurden, wie bereits in 3.3. und 3.4. beschrieben, durchgeführt. CCl_4 wurde beim Start der Reaktion mit Hilfe einer Mikroliterspritze direkt zur Inkubationslösung zugegeben (Endkonzentration o,ool ml CCl_4/ml Inkubat). Beim Start (O min) und nach lo, 2o, 3o und 4o min wurde jeweils eine Gasprobe aus dem Inkubationsgefäß entnommen und der Alkan-Gehalt gaschromatographisch bestimmt. In Abbildung 58 sind die Ergebnisse dargestellt. Als Kontrolle dienten Lebermikrosomen, die nur mit dem NADPH-regenerierenden System aber ohne CCl_4 inkubiert worden waren. Die Abbildung 58 zeigt deutlich, daß die Bildung der Alkane Ethan, Propan und n-Pentan durch CCl_4 stimuliert wird. Bei Inkubationen von CCl_4 mit Mikrosomen aber ohne NADPH-regenerierendes System konnte keine Alkan-Bildung beobachtet werden (ohne Abbildung). Ebenso wurden keine Alkane gebildet, wenn Mikrosomen ohne CCl_4 und ohne NADPH-regenerierendes System inkubiert wurden (ohne Abbildung).

Abb. 58:

oben: Alkan-Bildung durch CCl_4 in Lebermikrosomen (1 mg Protein/ml), die mit einem NADPH-regenerierenden System inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ s_x von 4 unabhängigen Versuchen.

unten: Alkan-Bildung bei der Inkubation von Lebermikrosomen (1 mg Protein/ml), die nur das NADPH-regenerierende System enthielt. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte von 2 Versuchen, die repräsentativ sind (s. Abb. lo-13,25,36,37 und 4o).


CCl_4
0,15
0,10
0,05
nmol / mg Protein
× —— × : Ethan
o —— o : Propan
Δ —— Δ : Pentan
0
10
20
30
40
min

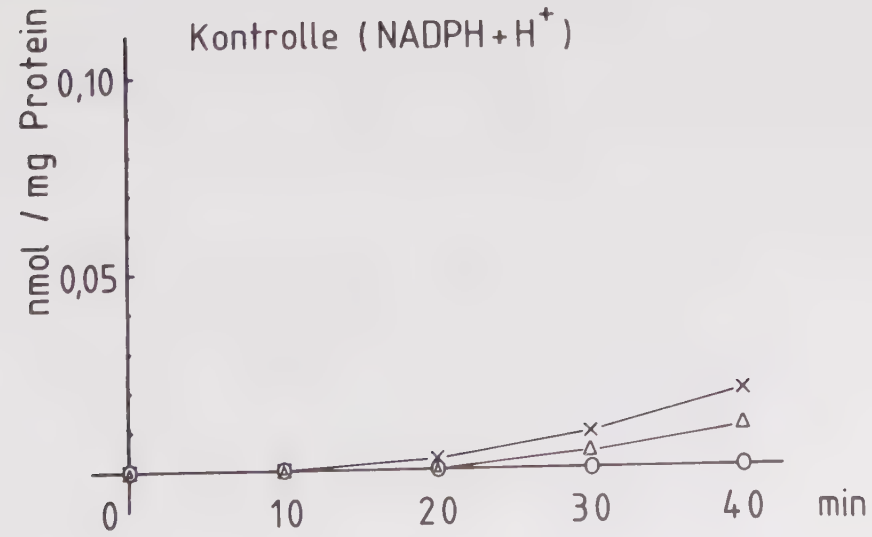

Kontrolle ($NADPH+H^+$)
0,10
0,05
nmol / mg Protein
0
10
20
30
40
min

Abb. 58

Zur Klärung der Frage, ob die bei der CCl_4-induzierten Lipidperoxidation gebildeten Hydroperoxide durch Fe^{2+}-Ionen gespalten werden können, wurden folgende Versuche durchgeführt: Lebermikrosomen wurden mit CCl_4 (Endkonzentration o,ool ml/ml Inkubat) und einem NADPH-regenerierenden System 4o min lang bei 37°C inkubiert. Unmittelbar nach dem Start der Reaktion und zur Zeit 4o min wurden Gasproben entnommen und gaschromatographisch analysiert. Danach wurde die Reaktion im geschlossenen Gefäß durch Zugabe einer TCA-Lösung (Endkonzentration lo %) gestoppt, die Fe^{2+}-Ionen (Endkonzentration 24 µM) enthielt. Nach weiteren 5 min Inkubation bei 37°C wurde noch eine weitere Gasprobe entnommen. Als Kontrollen dienten Inkubationen mit derselben CCl_4-haltigen Mikrosomensuspension, die aber nach 4o min Inkubation nur mit TCA-Lödung (Fe^{2+}-frei) gestoppt wurde. Außerdem wurden Kontrollinkubationen durchgeführt, bei denen nur Lebermikrosomen mit einem NADPH-regenerierenden System 4o min lang inkubiert wurden, und die danach entweder nur mit TCA-Lösung oder mit TCA-Fe^{2+}-Lösung gestoppt wurden. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 59 dargestellt. Es ergab sich kein Hinweis darauf, daß die während der Inkubation mit CCl_4 gebildeten Hydroperoxide so stabil sind, daß sie nur bei Zugabe von Eisen-Ionen zerfallen, wodurch unter anderem flüchtige Alkane gebildet werden. Die Abnahme der Alkan-Menge bei 45 min ist bedingt durch die Probenahme bei 4o min.

Abb. 59:

oben : Alkan-Bildung in Lebermikrosomen (1 mg Protein/ml), einem NADPH-reg. System nach 4o min Inkubation mit lo,3 µmol CCl_4/ml und nach Zugabe (t=4o min) von TCA-Fe^{2+}- bzw. nur TCA-Lösung. Die Endkonzentration von TCA war lo %, die der Fe^{2+}-Ionen war 24 µM. Mittelwerte $\pm$ s_x von 4 unabhängigen Versuchen sind dargestellt.

unten : Alkan-Bildung in Lebermikrosomen (1 mg Protein/ml), nach Inkubation mit einem NADPH-reg. System und nach Zugabe (t=4o min) von TCA- bzw. TCA-Fe^{2+}-Lösung. Die Endkonzentration von TCA war lo %, die der Fe^{2+}-Ionen 24 µM. Ein repräsentativer Versuch ist dargestellt.

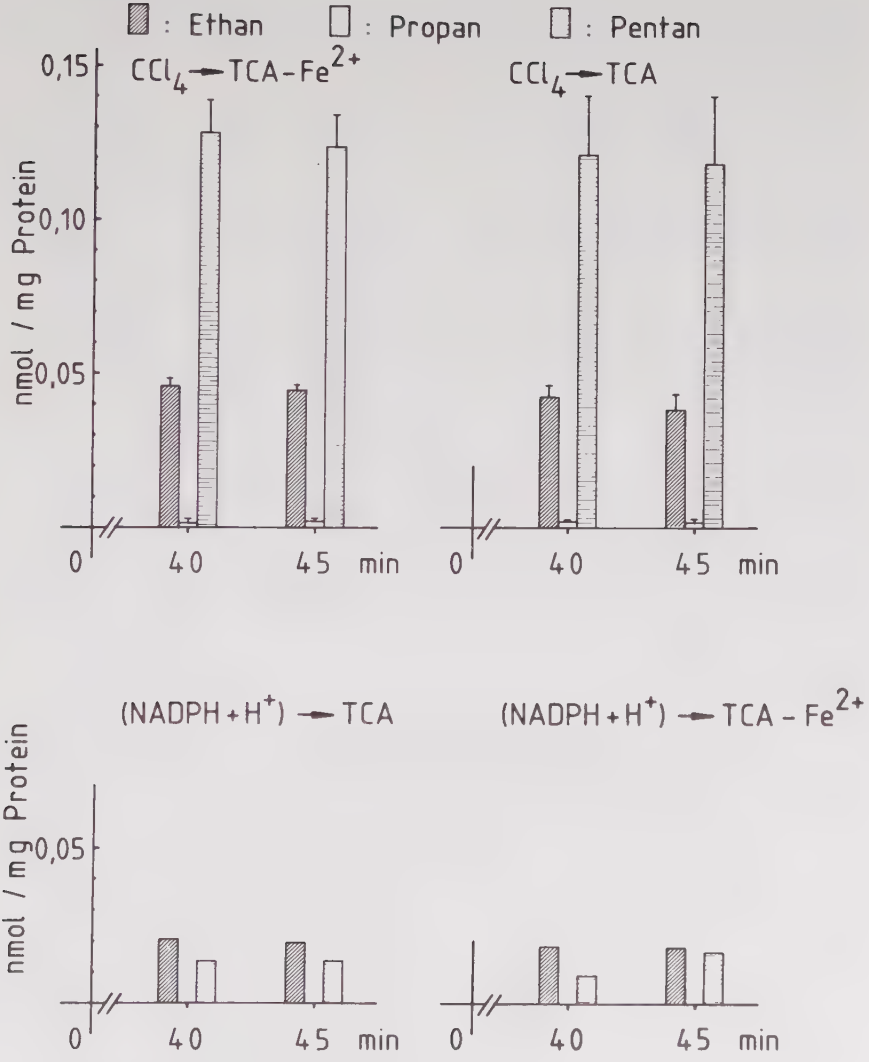

: Ethan
: Propan
: Pentan
$CCl_4 \rightarrow TCA - Fe^{2+}$
$CCl_4 \rightarrow TCA$
nmol / mg Protein
0,15
0,10
0,05
0
40
45
min
$(NADPH + H^+) \rightarrow TCA$
$(NADPH + H^+) \rightarrow TCA - Fe^{2+}$

Abb. 59

Um festzustellen, ob die durch CCl_4 gebildeten Hydroperoxide instabil sind und sofort zu den entsprechenden Alkanen zerfallen, wurden folgende Versuche durchgeführt: Lebermikrosomen wurden mit einem NADPH-regenerierenden System und CCl_4 3o min inkubiert.
Beim Start der Reaktion (Zugabe von $NADP^+$ und CCl_4, s. 3.4.) und zur Zeit 3o min wurden jeweils Gasproben entnommen und gaschromatographisch analysiert. Unmittelbar nach der Probenahme bei 3o min wurden o,o5 ml $FeCl_2$-Lösung (in H_2O) zur Inkubation zugegeben (Endkonzentration 24 µM Fe^{2+}). Nach weiteren 3 min Inkubation wurde noch einmal eine Gasprobe entnommen und die während dieser 3 min gebildete Alkan-Menge gaschromatographisch bestimmt. Als Kontrollen wurden parallel dazu Inkubationen mit CCl_4 durchgeführt, zu denen nach 3o min anstatt der Fe^{2+}-Lösung o,o5 ml H_2O zugesetzt wurden. Hier wurde ebenfalls 3 min weiter inkubiert. Weitere Kontrollversuche wurden mit Lebermikrosomen und einem NADPH-regenerierenden System aber ohne CCl_4 durchgeführt. Nach 3o min Inkubation wurden ebenfalls o,o5 ml $FeCl_2$-Lösung (Endkonzentration 24 µM Fe^{2+}) zugegeben und 3 min weiter inkubiert.

Abb. 6o:
oben : Alkan-Bildung in Lebermikrosomen (1 mg Protein/ml) nach Inkubation mit einem NADPH-reg. System und CCl_4 und nach Zugabe (t=3o min) von o,o5 ml $FeCl_2$-Lösung in H_2O. Die Endkonzentration von CCl_4 betrug 1o,3 µmol/ml, die von Fe^{2+}-Ionen 24 µM. Mittelwerte $\pm$ s_x von 4 unabhängigen Versuchen sind dargestellt.
unten links: Alkan-Bildung in Lebermikrosomen (1 mg Protein/ml) nach Inkubation mit einem NADPH-reg. System und CCl_4 und nach Zugabe (t=3o min) von o,o5 ml H_2O. Die Endkonzentration von CCl_4 war 1o,3 µmol/ml. Mittelwerte $\pm$ s_x von 3 unabhängigen Versuchen sind dargestellt.
unten rechts: Alkan-Bildung in Lebermikrosomen (1 mg Protein/ml) nach Inkubation mit einem NADPH-reg.Syst. und nach Zugabe (t=3o min) von o,o5 ml $FeCl_2$-Lsg. in H_2O. Die Endkonz. v. Fe^{2+}-Ionen war 24 µM. Mittelwerte $\pm$ s_x von 3 unabhängigen Versuchen sind dargestellt.

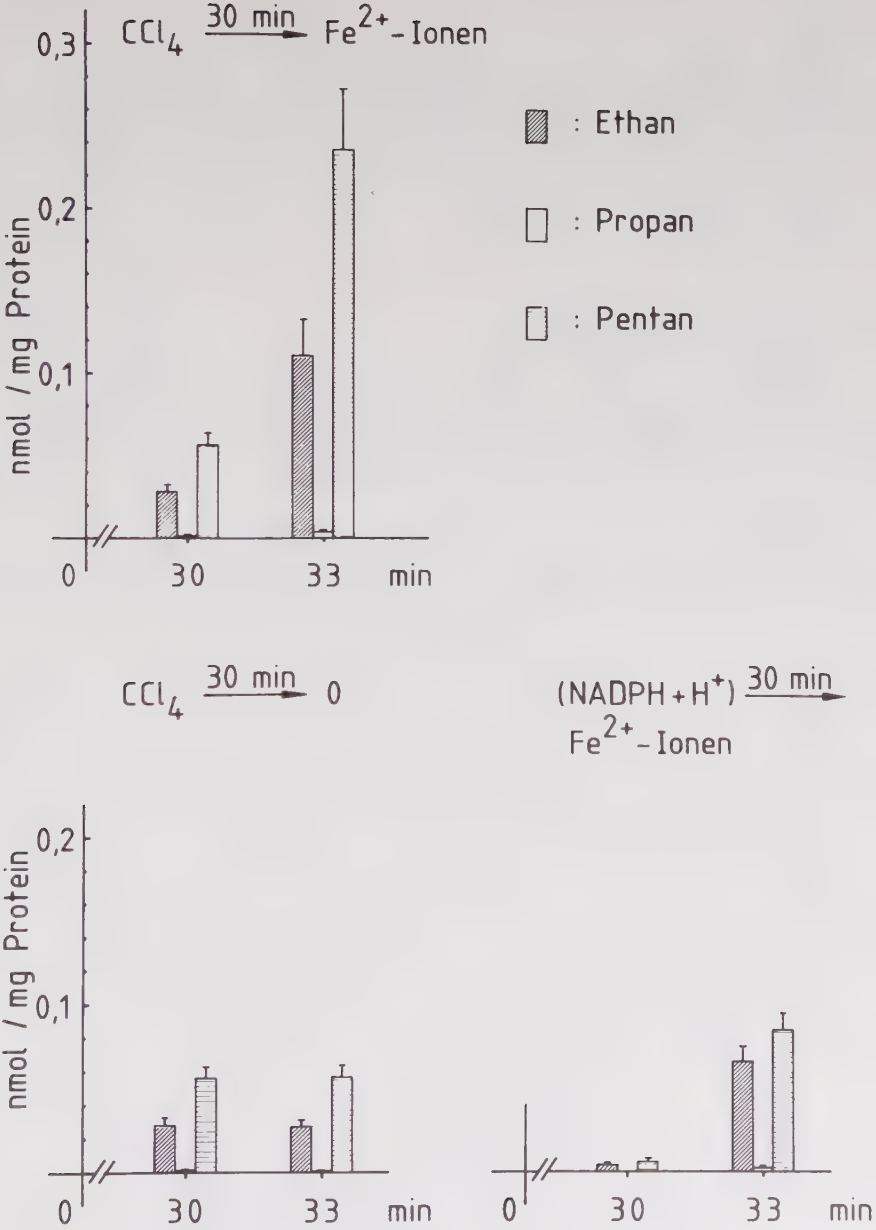

CCl4 30 min Fe2+-Ionen
0,3
0,2
0,1
nmol / mg Protein
: Ethan
: Propan
: Pentan
0
30
33
min
CCl4 30 min 0
(NADPH+H+) 30 min
Fe2+-Ionen
0,2
0,1
nmol / mg Protein
0
30
33
min
0
30
33
min

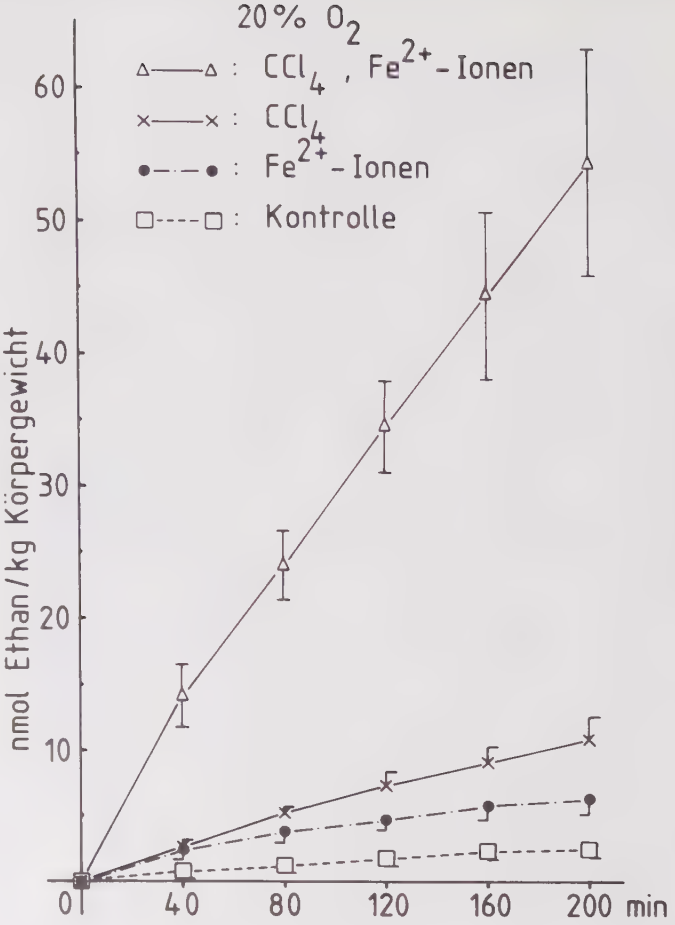
Abb. 60

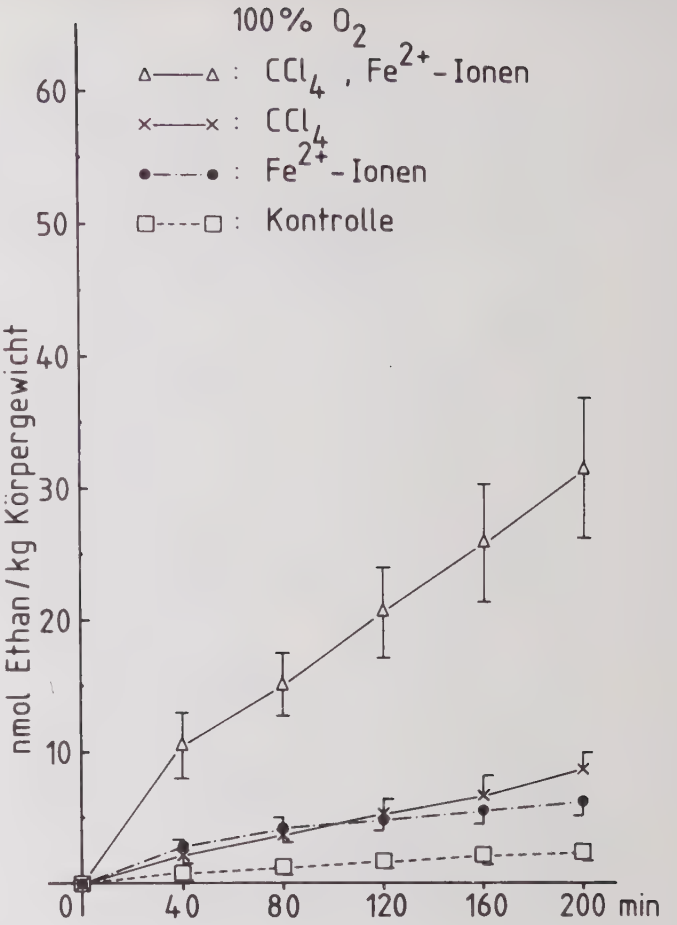
In Abbildung 6o sind die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt, die zeigen, daß Fe^{2+}-Ionen die CCl_4-bedingte Ethan-Bildung beeinflussen können. Der Anstieg war beim n-Pentan stärker ausgeprägt als beim Ethan. Es sieht so aus, als ob der Lipidperoxidzerfall zu Alkanen tatsächlich durch Fe^{2+}-Ionen katalysiert wird.

4.6.2. In vivo-Versuche

Die in vitro-Versuche zeigten, daß Fe^{2+}-Ionen bei der CCl_4-ausgelösten Ethan-Bildung eine Rolle spielen. Deshalb wurden ähnliche Versuche in vivo durchgeführt, um Aussagen zum Mechanismus der CCl_4-induzierten Ethan-Entstehung auch im Ganztier zu erhalten.
Alle Versuche mit CCl_4 und Fe^{2+}-Ionen wurden bei loo% und 2o% Sauerstoff durchgeführt, da die Sauerstoff-Konzentration die CCl_4-bedingte Lipidperoxidation stark beeinflußt (21). Dazu wurden die Tiere folgendermaßen behandelt: Ratten wurden zuerst mit 5oo mg CCl_4/kg Körpergewicht i.p. gespritzt. Fe^{2+}-Kontrolltiere erhielten o,9 %ige NaCl-Lösung i.p.. Nach 3o min wurden dieselben Tiere zusätzlich mit 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht (in Form einer $FeCl_2$-Lösung, s.4.2.) behandelt. Kontrolltiere wurden mit einer äquivalenten Menge einer o,9 %igen NaCl-Lösung i.p. gespritzt. Unmittelbar danach wurden diese Tiere in die Apparaturen gesetzt (s. Abb.2) und die Ethan-Abatmung 2oo min lang verfolgt (s. 3.6. und 3.7.).
In Abbildung 61 sind die Ergebnisse dargestellt.

Abb. 61: Ethan-Bildung von Ratten, die entweder 2o% Sauerstoff (2o % O_2/ 8o % N_2) oder loo % Sauerstoff atmeten, nach Behandlung mit:
Δ——Δ: 5oo mg CCl_4/kg KG i.p. und nach 3o min 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=6)
×——×: 5oo mg CCl_4/kg KG i.p. und nach 3o min o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=8)
●—·—●: o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. und nach 3o min 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=9)
□---□: o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. und nach 3o min o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=6)
Die Meßperiode begann (t=Omin) 3o min nach der ersten Behandlung und unmittelbar nach der zweiten. Mittelwerte $\pm$ s_x sind angegeben.


20% O_2
△——△ : CCl_4 , Fe^{2+}-Ionen
×——× : CCl_4
●–·–● : Fe^{2+}-Ionen
□----□ : Kontrolle
nmol Ethan/kg Körpergewicht
0
10
20
30
40
50
60
0
40
80
120
160
200 min

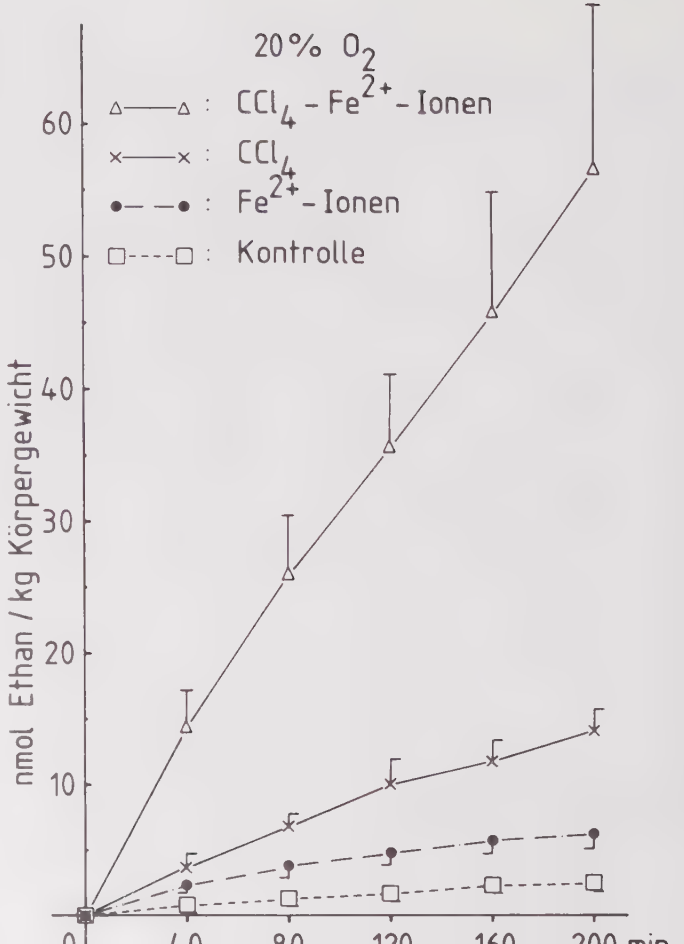

100% O_2
△——△ : CCl_4 , Fe^{2+}-Ionen
×——× : CCl_4
●–·–● : Fe^{2+}-Ionen
□----□ : Kontrolle
nmol Ethan/kg Körpergewicht
0
10
20
30
40
50
60
0
40
80
120
160
200 min

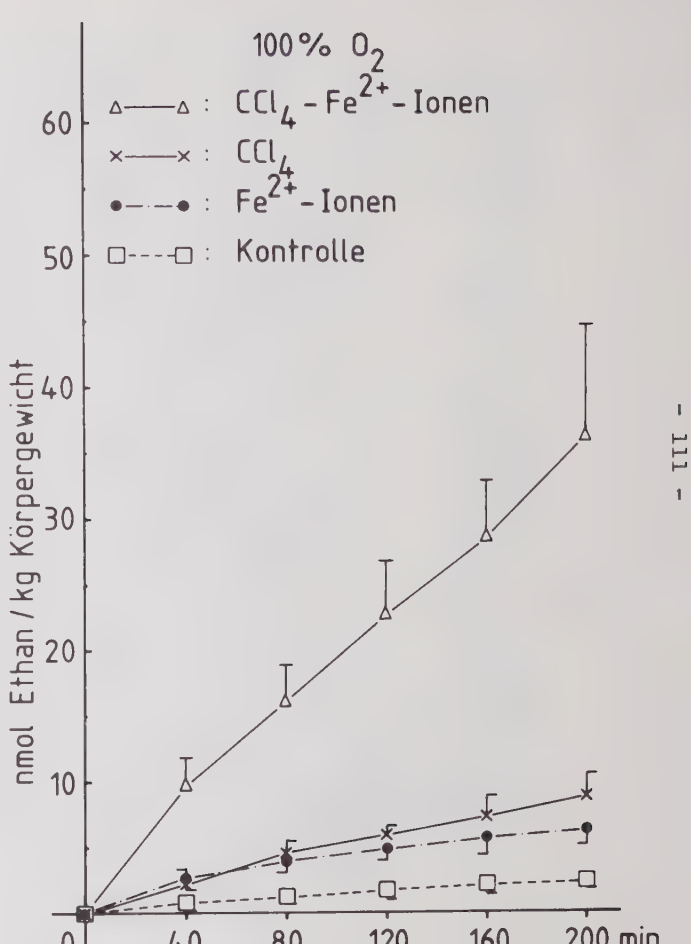
Die Abbildung zeigt deutlich, daß Fe^{2+}-Ionen die Ethan-Bildung verstärken können, wenn die Tiere vorher mit CCl_4 behandelt worden waren. Die Ethan-Werte liegen deutlich höher (ca. 2-fach) als die Summe der Ethan-Werte, die von CCl_4-behandelten Tieren und von Fe^{2+}-Ionen behandelten Tieren gebildet werden. Die Rolle der Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre, die die Tiere atmeten zeigt Abbildung 61 ebenfalls deutlich.
Bei niedriger Sauerstoffkonzentration (2o%) wird nach Behandlung mit CCl_4 und Fe^{2+}-Ionen etwa doppelt so viel Ethan gebildet wie bei hohen Konzentrationen (loo%). Diese Erhöhung der Ethan-Bildung kann nur durch die Wirkung von CCl_4 erklärt werden, da die Fe^{2+}-Ionen-induzierte Ethan-Bildung selbst unabhängig von der Sauerstoffkonzentration ist (vgl.Abb.61 u.Abb.17).

Um auszuschließen, daß die Anfangskinetik des CCl_4 im Organismus der Ratten die Ergebnisse wesentlich beeinflußt, wurden CCl_4 und Fe^{2+}-Ionen auch gleichzeitig injiziert. Die Tiere wurden mit 5oo mg CCl_4/kg Körpergewicht und 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht i.p. behandelt. Danach wurden sie sofort in die Apparaturen gesetzt und auf ihre Ethan-Abatmung untersucht. Die Kontrolltiere wurden entsprechend behandelt. Prinzipiell besteht ja bei der Behandlung mit CCl_4 und Fe^{2+}-Ionen im Abstand von 3o min die Möglichkeit, daß das injizierte CCl_4 weitgehend abgeatmet ist, wenn die Tiere erst 3o min nach der zweiten Behandlung in die Apparaturen gesetzt werden. Daß dies im vorliegenden Versuch keine Rolle gespielt hat, zeigt Abb. 62.

Abb. 62: Ethan-Bildung von Ratten, die entweder 2o% Sauerstoff (2o % O_2/ 8o % N_2) oder loo % Sauerstoff atmeten, nach gleichzeitiger Behandlung mit:
Δ———Δ : 5oo mg CCl_4/kg KG und 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=6)
×———× : 5oo mg CCl_4/kg KG und o,9 %iger NaCl-Lösg. i.p. (n=6)
●—·—·—● : 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=6)
□----□ : o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. (n=6)
Die Meßperiode begann (t=0 min) unmittelbar nach der Injektion. Mittelwerte $\pm s_x$ sind angegeben.

Abb. 62


20% O_2
△——△ : CCl_4 - Fe^{2+} - Ionen
×——× : CCl_4
●— —● : Fe^{2+} - Ionen
□----□ : Kontrolle
nmol Ethan / kg Körpergewicht
60
50
40
30
20
10
0
40
80
120
160
200 min


100% O_2
△——△ : CCl_4 - Fe^{2+} - Ionen
×——× : CCl_4
●— —● : Fe^{2+} - Ionen
□----□ : Kontrolle
nmol Ethan / kg Körpergewicht
60
50
40
30
20
10
0
40
80
120
160
200 min

Die Ethan-Mengen waren für alle Versuchsgruppen sehr ähnlich wie die Ethan-Werte in Abbildung 61. Der geringe Anstieg bei Behandlung mit CCl_4 alleine und 2o % O_2 war statistisch nicht signifikant.

Während dieser Versuche wurde beobachtet, daß außer Ethan relativ viel n-Pentan und etwas Propan gebildet wurden. Obwohl diese Parameter sich nicht genauso gut wie Ethan für die Erfassung der Lipidperoxidation in vivo eignen (s. 4.1.2. und Abb. 6), wurden sie in einem weiteren Versuch ebenfalls gemessen. Dazu wurden die Tiere zunächst mit 5oo mg CCl_4/kg Körpergewicht i.p. und nach 3o min mit 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht i.p. gespritzt. Unmittelbar danach wurden sie in die Apparaturen gesetzt. Die sofort und nach 2oo min entnommenen Gasproben wurden gaschromatographisch auf Ethan,Propan und n-Pentan untersucht (s. 3.8.). Als Kontrolltiere dienten Ratten, die nur mit CCl_4, nur mit Fe^{2+}-Ionen alleine oder nur mit o,9 %iger NaCl-Lösung i.p. behandelt worden waren (entsprechend den bereits beschriebenen Versuchen). Die Ergebnisse sind in Abbildung 63 dargestellt. Die Kontrolltiere, die o,9 %ige NaCl-Lösung erhalten hatten, atmeten sehr wenig Alkane ab und sind hier nicht gezeigt.
Tiere, die nur Fe^{2+}-Ionen erhalten hatten, atmeten nur Ethan und geringe Mengen von Propan, aber kein n-Pentan ab (s.4.2.2.). Wenn die Tiere aber mit CCl_4 oder mit CCl_4 und Fe^{2+}-Ionen behandelt wurden, wurden große Mengen von Ethan,Propan und n-Pentan gefunden. Bemerkenswert ist, daß der Einfluß von Fe^{2+}-Ionen auf die CCl_4-induzierte Alkan-Bildung auch bei Propan und n-Pentan auftritt. Der verstärkende Effekt von nur 2o% Sauerstoff auf die CCl_4-induzierte Alkan-Bildung gegenüber loo% Sauerstoff tritt ebenfalls bei Propan und n-Pentan in Erscheinung.

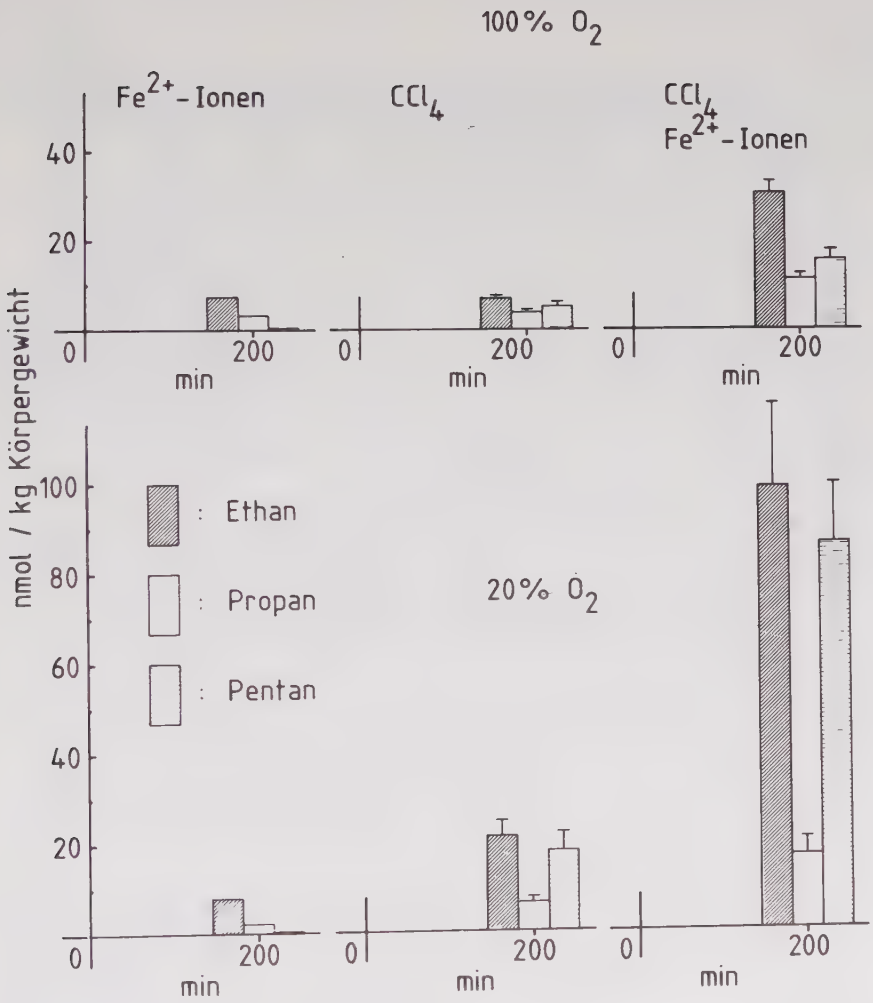
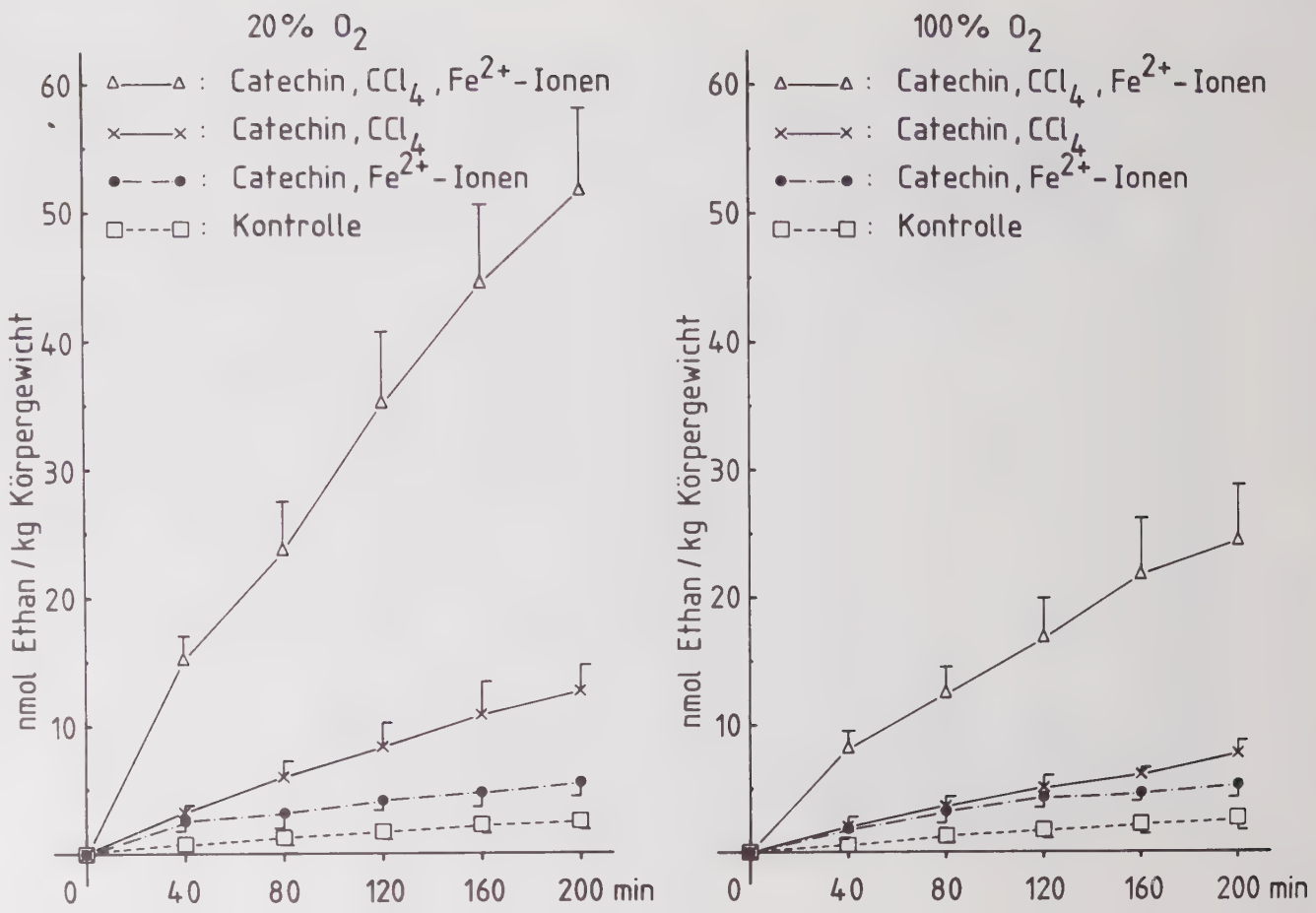


Abb. 63: Ethan-Bildung von Ratten, die entweder 20% Sauerstoff (20% O_2 / 80 % N_2) oder 100 % Sauerstoff atmeten, nach Behandlung mit:
50 mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (links; n=2)
500 mg CCl_4/kg KG i.p. (mitte; n=5)
500 mg CCl_4/kg KG i.p. und 30 min später 50 mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (rechts; n=5)
Die Meßperiode begann (t = 0 min) 30 min nach der ersten Behandlung. Mittelwerte $\pm$ s_x sind angegeben.

4.6.3. Einfluß von (+)-Catechin auf die durch CCl_4 und Fe^{2+}-Ionen induzierte Ethan-Bildung in vivo

Nachdem gezeigt werden konnte, daß (+)-Catechin die Fe^{2+}-ausgelöste Ethan-Bildung vermindern kann (s. 4.2.3.), wurde der Einfluß von (+)-Catechin auf den Verstärkereffekt der Fe^{2+}-Ionen auf die CCl_4-induzierte Ethan-Bildung untersucht. Dazu wurde Ratten zuerst 3oo mg (+)-Catechin/kg Körpergewicht, die in Borat-Puffer gelöst waren, p.o. verabreicht. Eine Stunde später wurden 5oo mg CCl_4/kg Körpergewicht und nach weiteren 3o min 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht i.p. gespritzt. Unmittelbar danach wurden diese Tiere in die Apparaturen gesetzt und das abgeatmete Ethan bestimmt.
Als Kontrolle wurden Ratten mit 3oo mg (+)-Catechin/kg Körpergewicht gespritzt. 3o min danach erhielten diese Tiere o,9 %-ige NaCl-Lösung i.p. gespritzt. Weitere Kontrolltiere erhielten entweder Borat-Puffer statt (+)-Catechin-Lösung oder o,9 %-ige NaCl-Lösung statt CCl_4 bzw. Fe^{2+}-Ionen. Abb. 64 zeigt die Ergebnisse. Die Verläufe der Zeitkurven der Ethan-Bildung bei 2o% O_2 unterscheiden sich fast nicht von denen in Abb.61, während bei loo% O_2 eine Hemmung beobachtet werden konnte. Daraus wird ersichtlich, daß (+)-Catechin einen geringen Einfluß auf den Verstärkereffekt der Fe^{2+}-Ionen auf die CCl_4-ausgelöste Ethan-Bildung in vivo hat.

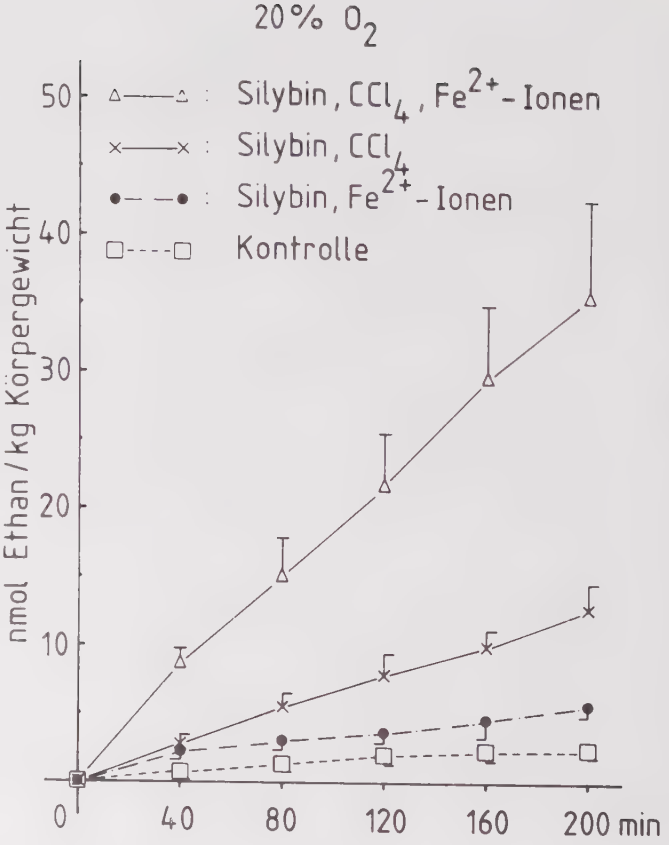
Abb. 64: Ethan-Bildung von Ratten, die entweder 2o% Sauerstoff (2o% O_2/8o% N_2) oder loo% Sauerstoff atmeten, nach der Behandlung mit:
Δ———Δ : 3oo mg (+)-Catechin/kg KG p.o., 1 Std. später 5oo mg CCl_4/kg KG i.p. und nach weiteren 3o min 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=6)
×———× : 3oo mg (+)-Catechin/kg KG p.o., 1 Std. später 5oo mg CCl_4/kg KG i.p. und nach weiteren 3o min o,9 %ige NaCl-Lsg.i.p. (n=6)
•—·—· : 3oo mg (+)-Catechin/kg KG p.o., 1 Std. später o,9 %iger NaCl-Lsg.i.p.und nach weiteren 3o min 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p.(n=6)
□---□ : Borat-Puffer p.o., 1 Std. später o,9 %ige NaCl-Lösg. i.p. und nach weiteren 3o min erneut o,9 %ige NaCl-Lsg. i.p. (n=6)
Die Meßperiode begann (t=O min) 9o min nach der ersten und unmittelbar nach der dritten Behandlung. Mittelwerte $\pm$ s_x sind angegeben.

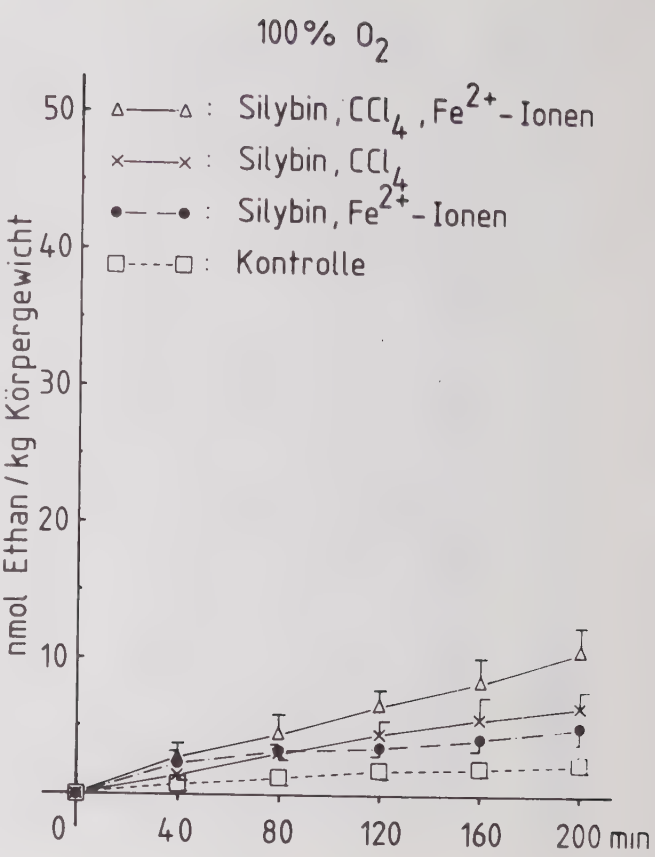

20% O_2
100% O_2
Catechin, CCl_4, Fe^{2+}-Ionen
Catechin, CCl_4
Catechin, Fe^{2+}-Ionen
Kontrolle
nmol Ethan / kg Körpergewicht
0
10
20
30
40
50
60
0
40
80
120
160
200 min

4.6.4. Einfluß von Silybin auf die durch CCl_4 und Fe^{2+}-Ionen induzierte Ethan-Bildung in vivo

Silybin, das die Fe^{2+}-induzierte Ethan-Bildung ebenfalls vermindern kann (s. 4.2.4.) wurde auch im Zusammenhang mit dem Verstärkereffekt von Fe^{2+}-Ionen auf die CCl_4-bedingte Ethan-Bildung eingesetzt. Silybin wurde in o,9 %iger NaCl-Lösung gelöst und i.p. gespritzt (3oo mg/kg Körpergewicht). Nach 1 Stunde wurden die Ratten mit 5oo mg CCl_4/kg Körpergewicht i.p. und nach weiteren 3o min mit 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht i.p. behandelt. Unmittelbar danach wurden sie in die Apparaturen gesetzt und auf ihre Ethan-Abatmung untersucht. Zur Kontrolle wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Tiere mit Silybin und CCl_4 und Fe^{2+}-Ionen oder mit Silybin und o,9 %iger NaCl-Lösung behandelt wurden.
Abbildung 65 zeigt die Ergebnisse. Gegenüber den Kurvenverläufen von Abb. 61 ist die Ethan-Bildung, die nach Behandlung mit CCl_4 und Fe^{2+}-Ionen auftritt, gehemmt, besonders bei den Versuchen, bei denen die Tiere loo% Sauerstoff atmeten.
Im Gegensatz zu (+)-Catechin vermindert Silybin also den Verstärkereffekt von Fe^{2+}-Ionen auf die CCl_4-ausgelöste Ethan-Bildung auch bei 2o % O_2, kann ihn aber nicht vollständig aufheben.

Abb. 65: Ethan-Bildung von Ratten, die entweder 2o% Sauerstoff (2o% O_2/8o% N_2) oder loo% Sauerstoff atmeten, nach Behandlung mit:
Δ———Δ : 3oo mg Silybin/kg KG i.p., 1 Std. später 5oo mg CCl_4/kg KG i.p. u. nach weit. 3o min 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=6)
x———x : 3oo mg Silybin/kg KG i.p., 1 Std. später 5oo mg CCl_4/kg KG i.p. u. nach weit. 3o min o,9 %iger NaCl-Lösg. i.p. (n=6)
•—·—·• : 3oo mg Silybin/kg KG i.p., 1 Std. später o,9 %iger NaCl-Lösg. i.p. u.nach weit. 3o min 5o mg Fe^{2+}-Ionen/kg KG i.p. (n=6)
□- - -□ : o,9 %iger NaCl-Lösg. i.p., 1 Std. später o,9 %iger NaCl-Lösg. i.p. u.nach weit. 3o min erneut o,9 %iger NaCl-Lösg. i.p.(n=6)
Die Meßperiode begann (t=O min) 9o min nach der ersten und unmittelbar nach der dritten Behandlung. Mittelwerte $\pm$ s_x sind angegeben.


20% O_2
Silybin, CCl_4, Fe^{2+}-Ionen
Silybin, CCl_4
Silybin, Fe^{2+}-Ionen
Kontrolle
nmol Ethan / kg Körpergewicht
0
10
20
30
40
50
40
80
120
160
200 min


100% O_2
Silybin, CCl_4, Fe^{2+}-Ionen
Silybin, CCl_4
Silybin, Fe^{2+}-Ionen
Kontrolle
nmol Ethan / kg Körpergewicht
0
10
20
30
40
50
40
80
120
160
200 min

5. DISKUSSION

5.1. Alkane als Parameter für eine Lipidperoxidation

Aus der Lebensmittelchemie sind Alkane als flüchtige Produkte der Autoxidation von ungesättigten Fettsäuren schon lange bekannt (2o, 21, 58). Im Zusammenhang mit der enzymatisch katalysierten Lipidperoxidation wurde die Methode zur Bestimmung flüchtiger Alkane in vitro zum ersten Mal von Garssen et al. (59, 6o) eingesetzt. Riely et al. (6) benutzten diese Methode 1974, um eine Lipidperoxidation in vivo im Tierversuch nachzuweisen. Sie bestimmten Ethan in der Atemluft von Mäusen.

Hauptsächlich entstehen bei einer Peroxidation von natürlichen ungesättigten Fettsäuren die Alkane Ethan und n-Pentan, während Propan und n-Butan aber auch Ethylen in geringeren Mengen gebildet werden (5, 6, 9, 2o, 21, 23, 24, 26 - 28, 58 - 6o).

Ethan wird bei Autoxidation bzw. enzymatisch katalysierter Peroxidation ω3-ungesättigter Fettsäuren, wie z. B. Linolensäure, gebildet (6, 22), während n-Pentan aus ω6-ungesättigter Fettsäure, wie z.B. Linolsäure oder Arachidonsäure, stammt (23, 26, 59, 6o).

Aus Versuchen mit reinen Fettsäure-Hydroperoxiden ist bekannt, daß die Alkane beim Zerfall dieser Hydroperoxide entstehen können (1o, 23, 24). Der Zerfall der Fettsäure-Hydroperoxide wird wahrscheinlich durch katalytische Mengen von Schwermetall-Ionen (Cu, Fe u.a.) katalysiert, wobei zunächst die entsprechenden Alkyl-Radikale entstehen dürften, die durch H-Abstraktion an anderen Fettsäuren neue Radikalkettenreaktionen auslösen (33). Durch Reaktion verschiedener Alkyl-

radikale miteinander können wahrscheinlich neben den großen Mengen von Ethan und n-Pentan auch die geringen Mengen von Propan, Ethylen und Butan erklärt werden.
Die Analyse dieser Alkane erfolgt gaschromatographisch. Verschiedene Arbeitsgruppen haben unterschiedliche Methoden entwickelt, die jedoch alle gewisse Vor- und Nachteile haben. Allgemein werden gepackte Säulen verwendet, wobei Anreicherung und Analyse in einem Schritt erfolgen, da die Mengen dieser Alkane in der Gas-Phase, besonders bei in vivo-Versuchen, sehr klein sind (10^{-11} bis 10^{-12} g Ethan in einer 5 ml Gasprobe). Deshalb müssen auch relativ große Volumina (bis 5 ml) analysiert werden. Die großen Probenmengen verhindern die Anwendung der Kapillargaschromatographie, wenn kein besonderes Anreicherungssystem vorhanden ist. Dies würde jedoch zu einer Verlängerung der Analysenzeit führen.

Riely et al. (6) verwendeten Aluminium-Oxid und Porapak N, während die Arbeitsgruppe von Tappel (10, 23, 24) nur mit aktiviertem Aluminium-Oxid als Trennmaterial arbeitet. Hafeman und Hoekstra (9, 27) benutzten Porapak R. Köster et al. (5, 25) benutzten Kieselgel als Trennmaterial, das man bei sehr hohen Temperaturen ausheizen kann, wenn Verunreinigungen beseitigt werden sollen. Außerdem ist dieses Trennmaterial inert gegenüber Sauerstoff, der normalerweise in großen Mengen in den Gasproben vorhanden ist.
Für die in vitro-Versuche wurde ein vollkommen neues System entwickelt (Abb. 1), das während der Inkubation eine Gasphase ohne Unter- oder Überdruck liefert und Kontaminationen aus der Laborluft ausschließt.
Die Versuche, die in 4.1.1. beschrieben wurden, haben gezeigt, daß diese in vitro-Inkubationsapparatur sehr gute, reproduzierbare Ergebnisse liefert. Ferner kann mit dieser Apparatur jedes beliebige biologische Material inkubiert werden. Außerdem

kann man die Gasphasen-Zusammensetzung, z.B. unterschiedliche Sauerstoffmengen in der Inkubationsluft, vor der Inkubation bei 37°C einstellen (s. 3.3.).

Für Tierversuche in vivo, bei denen die Menge der abgeatmeten Alkane bestimmt wird, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung: Tappel et al. (lo, 26), bevorzugen eine ziemlich aufwendige Methode, bei der die Atemluft der Tiere in Ethanolhaltigem flüssigen Stickstoff (-130°C) eingefroren wird. Die Tiere werden hierbei in einen Käfig gesetzt, in dem sie mit einer Halskrause festgehalten werden.
Die Atemluft (Kohlenwasserstoff-freie Synthetische Luft) strömt am Kopf der Tiere vorbei und wird anschließend in einer Kühlfalle gesammelt. Die Analyse erfolgt durch Anschließen dieser Kühlfalle an den Gaschromatographen unter schnellem Erhitzen. Die Methode hat den Nachteil, daß die an den Tieren vorbeiströmende Luftmenge exakt gemessen werden muß, und daß große Mengen Synthetischer Luft verbraucht werden. Hafeman und Hoekstra (9, 27) benutzten eine Methode, bei der die Tiere in einen käfigartigen Raum gesetzt werden. Die Luft wird im Zyklus mit Hilfe einer Pumpe über verschiedene Reinigungsanlagen geleitet und währenddessen mit Sauerstoff angereichert. Beim Durchlaufen der Reinigungssysteme können Komplikationen auftreten, da verschiedene Behälter mit Reinigungsflüssigkeit und eine Kühlfalle zwischengeschaltet sind. Bolt et al. (56) entwickelten eine Methode, bei der die Tiere in einen Exsikkator gesetzt werden, der über eine Waschflasche an ein Sauerstoffversorgungssystem angeschlossen ist, und der Atemkalk (CaO) zur CO_2-Absorption enthält (Abb. 2).
Die abgeatmeten Alkane akkumulieren im Gasraum des Exsikkators. Diese Methode ist sehr einfach und hat sich auch während der Versuche zu dieser Arbeit bewährt.

Es hat sich gezeigt, daß Ethan ein viel besserer Parameter als n-Pentan ist, da n-Pentan von den Tieren aufgenommen wird, wahrscheinlich weil es einen höheren Siedepunkt als Ethan hat (Abb. 6). Möglicherweise erklärt dies auch, warum in vivo weniger n-Pentan gefunden werden kann als in vitro. Das Verhältnis von Ethan und n-Pentan ist z.B. nach CCl_4-Behandlung von Ratten 1:1 (s. Abb. 63), während es bei Mikrosomen, die mit CCl_4 inkubiert wurden 1:2 beträgt (Abb. 58 und 63).

Es wurde auch diskutiert, daß die gebildeten Alkane im Tierkörper angereichert und metabolisiert werden könnten (28). Dieses Phänomen könnte bei n-Pentan eine Rolle spielen, das aus dem System zu einem gewissen Anteil verschwindet. Bei Ethan trifft dies jedoch nicht zu (s. Abb. 6).
Die verwendeten Tiere befanden sich in der Regel ca. 1 Woche lang im Tierhaus des Instituts. Man weiß jedoch, daß die Stadt-Luft geringe Mengen Ethan, Ethylen, Propan und andere Alkane enthält ; je nach Wetterlage konnten in unserem Labor bis 4o vpb gemessen werden. Nach den vorliegenden Ergebnissen (s. 4.1.3.) ist es sehr unwahrscheinlich, daß sich Ethan im Körper der Tiere vor Versuchsbeginn angereichert hat. Für n-Pentan kann dies jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Frank et al. (28) haben aus Expositionsversuchen mit Ratten den Schluß gezogen, daß in Gegenwart hoher Alkan-Konzentrationen (bis loooo vpm Ethan bzw. n-Pentan) eine Anreicherung bzw. Metabolisierung der Alkane stattfinden könnte. Bei sehr niedrigen Konzentrationen von Ethan bzw. n-Pentan scheint jedoch das Gleichgewicht weit auf der Seite der Gasphase zu liegen. Dies gilt besonders für Ethan (s. Abb. 4).
Die einzige Erklärung, warum Tiere, die vor dem Experiment 24 Stunden mit Kohlenwasserstoff-freier Luft "begast" wurden, Ethan (2,5 nmol/kg/6 Stunden) abatmeten, ist in einer endogenen Lipidperoxidation zu sehen, die wahrscheinlich in allen

Organismen ständig abläuft.
Die vorliegenden Versuche haben zum ersten Mal zweifelsfrei gezeigt, daß die Alkan-Bildung unbehandelter Ratten auf eine endogene Produktion zurückgeführt werden kann und nicht auf eine Akkumulation exogen zugeführter Alkan-Mengen. Die Tatsache, daß Alkane auch unter physiologischen Bedingungen, wenn auch in sehr geringen Mengen, gebildet werden, hat weitreichende Konsequenzen für die Beurteilung der Lipidperoxidation als physiologischer oder toxischer Prozeß (s. 5.7.).

5.2. Fe^{2+} als Initiator einer Lipidperoxidation

In Lebermikrosomen wurde die Lipidperoxidation durch Fe^{2+}- bzw. Fe^{3+}-ADP-Komplexe zum ersten Mal von Hochstein und Ernster (31, 32) ausgelöst. Sie benutzten die allgemein übliche Methode der Bestimmung von Thiobarbitursäure-reaktiven Produkten und die Messung des Sauerstoff-Verbrauchs als Parameter einer Lipidperoxidation.
Flüchtige Alkane als Parameter einer Fe-ADP-induzierten Lipidperoxidation wurden zum ersten Mal im Rahmen meiner Diplomarbeit (57) untersucht. Dabei hat sich gezeigt, daß Malondialdehyd- und Alkan-Bildung sehr gut korrelieren. Wills (63, 64) hat berichtet, daß auch Fe^{2+}- bzw. Fe^{3+}-Ionen alleine mit Mikrosomen in Gegenwart von NADPH oder Ascorbinsäure Malondialdehyd bilden können, während andere Metall-Ionen die Malondialdehyd-Bildung hemmen.
Bei in vitro-Inkubationen mit Fe^{2+}-Ionen (Abb. lo - 12) entstanden etwa die gleichen Alkan-Mengen wie mit Fe^{2+}-ADP (57). Die Verhältnisse von Ethan und n-Pentan waren ebenfalls dieselben (1:2). Die Fe^{2+}-ADP-induzierte Alkan-Bildung erreich-

te innerhalb von etwa 3o min ein Maximum (57), während die nur durch Fe^{2+} induzierte Alkan-Bildung schon nach ca. 15 min ein Plateau erreichte (Abb. lo - 12). Vielleicht lösen sich bei der Fe^{2+}-ADP-induzierten Lipidperoxidation Fe^{2+}-Ionen erst langsam aus dem Fe^{2+}-ADP-Komplex (63, 64). Möglicherweise werden die Fe^{2+}-Ionen aber auch von anderen mikrosomalen Bestandteilen komplexiert (35).
Bei Zugabe von Fe^{2+}-Ionen zu Mikrosomen setzt unter aeroben Bedingungen sofort eine Alkan-Bildung ein, die aber schnell wieder abbricht, wenn kein NADPH nachgeliefert wird (Abb. lo - 12). Ähnliche Befunde wurden mit Malondialdehyd erhoben, was als Beweis dafür angesehen wird, daß die Initiation der Lipidperoxidation NADPH-abhängig ist.

Wie Kornbrust und Mavis (65) vor kurzem zeigten, kann der Abbruch der Lipidperoxidation auch auf eine Erschöpfung der Fe^{2+}-Ionen zurückgeführt werden, zumal mit Fe^{3+} nur in Gegenwart von NADPH eine Malondialdehyd-Bildung gefunden wird, während mit Fe^{2+} sofort nach Zugabe eine gewisse Malondialdehyd-Menge auch ohne NADPH meßbar ist (7, 65).
Zum Mechanismus der Lipidperoxidation durch Fe^{2+}-Ionen gibt es verschiedene Theorien. Alle basieren auf einer Aktivierung von Sauerstoff durch Fe-Ionen. Ob die "reaktiven" Sauerstoffspezies frei oder als instabile Übergangskomplexe mit Eisen auftreten, ist nicht klar (38). Eine zentrale Bedeutung hat in diesem Zusammenhang das Superoxid-Radikal ($^{\cdot}O_2^-$), das in Gegenwart von NADPH in Mikrosomen immer entsteht (66 - 68).

Die Superoxid-Dismutase, ein Enzym, das zwei Superoxid-Radikale zu O_2 und H_2O_2 dismutiert, wobei Triplett-Sauerstoff gebildet wird und nicht Singulett-Sauerstoff, der bei der spontanen Dismutation entsteht, kann eine Lipidperoxidation in bestimmten Systemen hemmen, während Katalase dazu kaum in der

Lage ist (38, 69). Lange wurde die Beteiligung von $^{\cdot}O_2^-$ bei der mikrosomalen Lipidperoxidation angezweifelt, da die Superoxid-Dismutase in Mikrosomen die Lipidperoxidation nur wenig hemmen konnte. Neuere Untersuchungen mit Kupfer-Komplexen, die Superoxid-Dismutase-Eigenschaften haben, ergaben jedoch eine Hemmung (7o). Wahrscheinlich hemmt die Superoxid-Dismutase in Mikrosomen nicht ausreichend gut, da sie nicht in die Mikrosomenmembran eindringen kann. Da $^{\cdot}O_2^-$ aber wenig reaktiv ist, wird allgemein angenommen, daß Umwandlungsprodukte von Superoxid für die Lipidperoxidation verantwortlich sind (38). Superoxid-Radikale reagieren nach Haber-Weiss (71) mit Wasserstoffperoxid:

$$^{\cdot}O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^- + {}^{\cdot}OH \qquad (1)$$

Das OH-Radikal kann mit ungesättigten Fettsäuren unter H-Abstraktion zur Initiation einer Lipidperoxidation führen, wobei an das entstandene C-Radikal der Fettsäure molekularer Sauerstoff angelagert wird (s. Abb. 66). Es kann aber auch mit H_2O_2 reagieren und im sogenannten Haber-Weiss-Zyklus wieder $^{\cdot}O_2^-$ bilden:

$$^{\cdot}OH + H_2O_2 \longrightarrow {}^{\cdot}O_2^- + H_2O + H^+ \qquad (2)$$

Eine weitere Reaktion, die das OH-Radikal eingehen kann, ist die Reaktion mit $^{\cdot}O_2^-$, wobei Singulett-Sauerstoff entsteht:

$$^{\cdot}OH + {}^{\cdot}O_2^- \longrightarrow {}^1O_2 + OH^- \qquad (3)$$

Nach neueren Untersuchungen kann die Reaktion (1) nur dann ablaufen, wenn bestimmte Metall-Ionen, wie z.B. Fe^{2+}, in katalytischen Mengen vorhanden sind (44, 45).

Nach Fenton (72) können OH-Radikale bei der Reaktion von Fe^{2+} mit H_2O_2 entstehen:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + {}^{\cdot}OH \qquad (4)$$

Dabei werden die Fe^{2+}-Ionen jedoch "verbraucht" im Gegensatz zur oben genannten Reaktion (1). Die Reaktionen (2) und (3) könnten anschließend ebenfalls ablaufen.
Die Frage, ob die Lipidperoxidation durch OH-Radikale ausgelöst wird oder durch Singulett-Sauerstoff, der aus Reaktion (3) oder bei spontaner Dismutation von ${}^{\cdot}O_2^-$ entsteht, bleibt weiter ungeklärt (2, 38). Andererseits könnte auch ein $Fe^{2+}O_2$-Komplex oder ein entsprechender Fe-Chelat-O_2-Komplex direkt eine Lipidperoxidation auslösen (35). Solche Fe-O_2-Komplexe könnten direkt eine H-Abstraktion an einer Methylengruppe einer ungesättigten Fettsäure bewirken (Abb. 66).
Bei der radikalischen H-Abstraktion am Lipid würden Fe^{3+} und Wasserstoffperoxid entstehen (Abb. 66). Bei mikrosomaler Lipidperoxidation konnten große Mengen von H_2O_2 nachgewiesen werden (67). Wasserstoffperoxid wird in der Zelle durch Katalase und Glutathion-Peroxidase beseitigt. Mikrosomen enthalten immer noch genügend Katalase als Verunreinigung. Das oxidierte Eisen-Ion (Fe^{3+}) wird wahrscheinlich enzymatisch wieder zu Fe^{2+} reduziert. Wahrscheinlich wird diese Reaktion durch die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase katalysiert (1, 35, 36, 55, 73). Dies kann aus Versuchen mit isolierter NADPH-Cytochrom P450 Reduktase abgeleitet werden (33- 37), wobei allerdings nicht geklärt ist, ob die Reduktion von Fe^{3+} durch direkte Elektronenübertragung erfolgt, oder durch enzymatisch gebildetes ${}^{\cdot}O_2^-$, das Fe^{3+}reduziert, wobei O_2 und Fe^{2+} entstehen.
In allen beschriebenen Fällen würden zunächst C-Radikale am

Lipid entstehen, die zusammen mit molekularem O_2 weitere Radikalkettenreaktionen auslösen (Abb. 66).

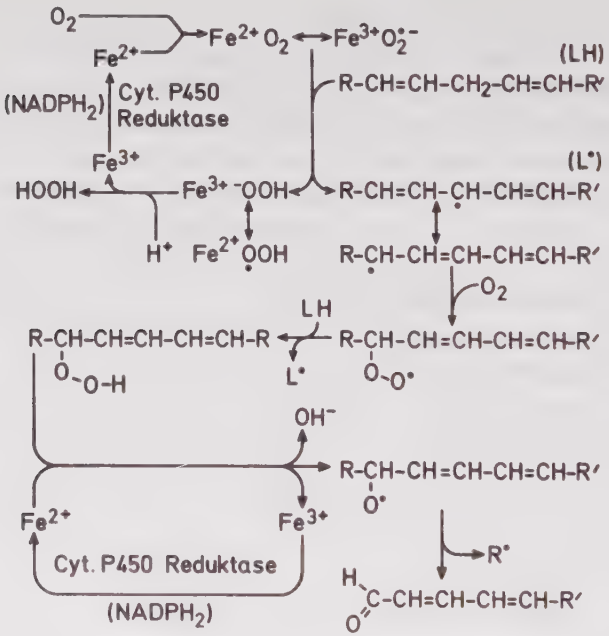


Abb. 66: Theoretischer Mechanismus der Fe^{2+}-induzierten Lipidperoxidation: Initiation durch Fe^{2+} und O_2 und Propagation durch Fe^{2+}.
LH = Mehrfach-ungesättigte Fettsäure (Lipid)
L• = Fettsäure-Radikal (Lipid-Radikal)
R = ω-Rest
R' = Carboxyl-haltiger Rest
R• = Alkyl-Radikal
Cyt. = Cytochrom

Unter anderem bestehen dabei Lipidhydroperoxide. Die Lipidhydroperoxide zerfallen wahrscheinlich durch Fe-Katalyse zu Aldehyden und Alkylradikalen (s. 5.6.) z.B. entstehen die hier gemessenen Alkane (s. Abb. 69, 7o).
Die entstandenen Fe^{3+}-Ionen könnten ebenfalls wieder durch die NADPH-Cytochrom P45O Reduktase reduziert werden. Somit hätten die Fe-Ionen bei der Lipidperoxidation zwei verschiedene Funktionen. Die eine besteht in der Initiation der Lipidperoxidation, die andere wäre die Propagation. Bewiesen sind die zugrundeliegenden Mechanismen aber noch keineswegs.

Im Ganztier müssen zusätzliche Faktoren berücksichtigt werden, wie z.B. Verteilung der Fe^{2+}-Ionen im Körper und Bindung an Proteine (Transferrine) und andere Moleküle. Außerdem kennt man die Konzentrationen von Fe in den verschiedenen Geweben und Zellkompartimenten nicht, da freies Fe immer im Gleichgewicht mit gebundenem Fe vorliegt.
Die Versuche mit Tieren, die verschiedene Fe^{2+}-Mengen gespritzt bekamen, haben gezeigt, daß es eine "Schwellendosis" von Fe^{2+} bezüglich der Ethan-Bildung gibt (s. Abb. 15). Sie liegt zwischen 4o - 5o mg Fe^{2+}/ kg Körpergewicht. Dieser Befund kann nur damit erklärt werden, daß die Fe^{2+}-Ionen im Körper der Tiere erst ab einer bestimmten Konzentration in freier Form vorliegen. Wahrscheinlich wird die gesamte gespritzte Fe-Menge zunächst gebunden (u.a. durch Transferrine). Erst nach Absättigung aller Bindungsstellen liegen freie Fe-Ionen vor. Diese freien Fe-Ionen können dann zusammen mit Sauerstoff eine Lipidperoxidation und damit auch eine Alkan-Bildung auslösen, was im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden konnte. Bei einigen Vorversuchen (ohne Darstellung) mit sehr hohen Fe^{2+}-Dosen (bis 5oo mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht) starben die Tiere innerhalb von lo Minuten nach In-

jektion. Selbst bei einer Dosis von loo mg Fe^{2+}-Ionen/kg Körpergewicht starben die Tiere innerhalb von 24 Stunden nach der Injektion (s. 4.2.2.). Im Vergleich zu CCl_4, das bei Injektion von 1,5 g/kg Körpergewicht letal war,und durch das eine große Menge Ethan gebildet wurde (8), führten die toxischen Dosen von Fe^{2+} zu relativ wenig Ethan (Abb. 14, 15). n-Pentan wurde in vivo selbst bei sehr hohen Dosen von Fe^{2+}, die injiziert wurden, nie gefunden. Dagegen wurde bei CCl_4-behandelten Tieren eine große Menge n-Pentan gebildet (Abb. 63).
Diese Versuche stimmen mit der Theorie überein, daß der Mechanismus der Fe^{2+}-induzierten Lipidperoxidation nicht derselbe ist wie der, der durch CCl_4 ausgelöst wird (1, 3, 7).

Außerdem bleibt auch aufgrund dieser Befunde die Frage offen, ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen der Toxizität und einer Lipidperoxidation besteht.
Möglicherweise lösen Fe^{2+}-Ionen nur in bestimmten Zellen des Körpers eine Lipidperoxidation aus, so daß diese lokal wesentlich stärker wäre, als man aufgrund der Ethan-Abatmung messen kann. Eventuell gibt es aber auch gegenüber einer Lipidperoxidation besonders empfindliche Zellen, z.B. solche, die wenig oder keine Schutzfaktoren gegen diese Reaktion besitzen (1, lo - 13). Unter anderem verhindern sogenannte Antioxidantien, wie z.B. Vitamin E, die Auswirkungen der Lipidperoxidation. Viele Antioxidantien haben eine chinoide Struktur, die einen Redoxwechsel durchlaufen können. Dazu gehören auch alle Catechol-Verbindungen (ortho-Hydrochinone = 1,2-Dihydroxybenzole), die als Radikalfänger wirken können. Sie fangen z.B. sehr effektiv Superoxid-Radikale ab (67, 74). Nach Kappus et al. (55) ist die freie Catecholstruktur für eine Hemmung der Lipidperoxidation essentiell. Die Reststruktur kann dagegen variieren.

(+)-Catechin, ein Flavonoid, das zur Therapie von Leberschäden eingesetzt wird (75), gehört zu dieser Substanzklasse. Nach Schulze (7) hemmt (+)-Catechin in vitro hauptsächlich die Initiation der Fe^{2+}-induzierten Lipidperoxidation. Die vorliegenden in vivo-Versuche zeigen jedoch, daß (+)-Catechin einen relativ geringen Einfluß auf die durch Fe^{2+}-Ionen ausgelöste Ethan-Bildung hat (Abb. 2o, 21). Eventuell sind in vivo die Verteilungsphänomene von größerer Bedeutung, wobei in den Zellen, in denen die Lipidperoxidation durch Fe^{2+} ausgelöst wird, kein (+)-Catechin vorhanden wäre; denn (+)-Catechin akkumuliert vor allem in der Leber und ist gegenüber der Lipidperoxidation in Lebermikrosomen sehr wohl wirksam (7, 55). Der Befund, daß n-Pentan unter CCl_4 in vivo entsteht, und daß mit CCl_4 oder Fe^{2+} in Lebermikrosomen ebenfalls n-Pentan gebildet wird, n-Pentan aber in vivo nach Fe^{2+}-Behandlung nicht entsteht, läßt ohnehin vermuten, daß die Fe-ausgelöste Lipidperoxidation in vivo, gemessen durch Ethan-Bildung, nicht in der Leber abläuft. Dafür sprechen auch die Befunde (Abb. 2o - 22), die mit Silybin erhalten wurden, das ebenfalls zur Therapie von Leberschäden eingesetzt wird. Dieses muß in der Leber sogar erst noch demethyliert werden, bevor es als Antioxidans wirksam werden kann (61). Ein Hemmeffekt der Fe^{2+}-induzierten Ethan-Bildung konnte nämlich erst bei sehr hohen Silybin-Dosen erzielt werden (Abb.22).

5.3. Bleomycin als Initiator einer Lipidperoxidation

Bleomycin ist ein Oligopeptid, das aus Streptomyces Verticulus isoliert werden kann. Dieses Antibioticum wurde zum ersten Mal von Umezawa et al. (76) isoliert und besitzt gute zytostatische Eigenschaften. Seit einigen Jahren wird dieses Zytostatikum bei der Therapie verschiedener Tumoren erfolgreich eingesetzt (39, 4o, 62). Bei Anwendung des Bleomycins treten

aber erhebliche Nebenwirkungen auf, unter anderem entwikkeln 2o - 3o% aller behandelten Patienten eine atypische Lungenfibrose, die bis zum Tod führen kann (39, 4o, 62).

Über den biologischen Wirkungsmechanismus von Bleomycin bestehen bisher nur hypothetische Vorstellungen. Man weiß bis jetzt, daß Bleomycin die DNS-Synthese hemmen kann, andererseits aber konnte eine Hemmung der DNS-Polymerase in vitro nicht nachgewiesen werden. Bleomycin verursacht außerdem Strangbrüche in der DNS, womit die Hemmung des Zellwachstums ebenfalls erklärt werden könnte.
Zahlreiche Autoren sind der Meinung, daß ein Bleomycin-Eisen-Ionen-Komplex für die DNS-Strangbrüche verantwortlich ist (4o). In vitro ist ein solcher Bleomycin-Eisen-Komplex leicht herstellbar. Es konnte gezeigt werden, daß der Komplex in der Lage ist, Sauerstoff-Moleküle zu Superoxid-Radikalen ($^{\cdot}O_2^-$) zu reduzieren (s. Abb. 67).

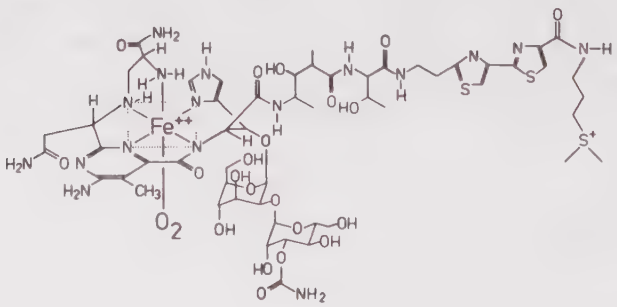


Abb. 67: Struktur des Bleomycin-Fe^{2+}-Sauerstoff-Komplexes. (Bleomycin A_2 ist dargestellt, modifiziert nach (39))

Dieses relativ wenig reaktive Sauerstoff-Molekül könnte in einer Haber-Weiss-Reaktion (38 , 47, 69, 71, 77) zum Hydroxyl-Radikal und zu Singulett-Sauerstoff weiter reagieren (s. 5.2.). Neuere Arbeiten machen die Entstehung dieser beiden reaktiven Sauerstoff-Spezies sehr wahrscheinlich (4o - 42). Es entstehen nämlich mit Bleomycin-Fe-Komplexen unter O_2 dieselben DNS-Strangbrüche und dieselben DNS-Abbau-Produkte, wie beim Angriff von chemisch erzeugten $^{\cdot}OH$-Radikalen (4o, 78, 79). Die $^{\cdot}OH$-Radikale könnten andererseits aber auch eine Lipidperoxidation auslösen (s. 5.2.).

Die vorliegenden Untersuchungen mit Rattenlebermikrosomen wurden zur Klärung dieser Frage durchgeführt. Eine Erhöhung der Alkan-Bildung konnten wir mit Bleomycin alleine nicht beobachten (Abb. 25, Tab. 1). Fe^{2+}-Ionen alleine führten zur üblichen Alkan-Bildung (vgl. Abb. lo - 13), die interessanterweise durch zugesetzte DNS nicht beeinflußt werden konnte (Tab.1). Ein Bleomycin-Eisen-Komplex bewirkte eine weitere Erhöhung der Alkan-Bildung im Vergleich zu Fe^{2+}-Ionen alleine (Abb.26, Tab. 1). Die DNS-Zugabe hatte ebenfalls kaum einen Einfluß auf diese Alkan-Bildung. Diese Befunde zeigen eindeutig, daß der Bleomycin-Eisen-Komplex in Gegenwart von Sauerstoff eine Lipidperoxidation auslösen kann. Die Methode der Alkan-Bestimmung hat sich in diesem Fall besonders bewährt, da die Alkane nur aus den Lipidmembranen stammen können, während Thiobarbitursäure-reaktives Material bzw. Malondialdehyd auch beim Angriff des Bleomycin-Eisen-Komplexes an der DNS entstehen kann (78 - 8o). Die Tatsache, daß die Alkan-Bildung auch bei der Lipidperoxidation, die durch den Bleomycin-Fe^{2+}-Komplex ausgelöst wurde, von NADPH abhängig war, ist in Übereinstimmung mit den Versuchen mit Fe^{2+} alleine (Abb. 26). Wahrscheinlich kann Bleomycin nur mit Fe^{2+} einen Komplex bilden und erst danach Sauerstoff binden.

Ein NADPH-abhängiges Enzym der Mikrosomen, wahrscheinlich die Cytochrom P450 Reduktase, würde "verbrauchtes" Eisen (Fe^{3+}) immer wieder zum Fe^{2+} reduzieren. Es ist aber auch denkbar, daß ein noch intakter Bleomycin-Fe^{3+}-Komplex, der bei der O_2-Reduktion entsteht, durch die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase nach folgendem Schema reduziert wird:

$$\text{Bleomycin-Fe}^{2+} + O_2 \longrightarrow \text{Bleomycin-Fe}^{3+} + \cdot O_2^-$$

$$\text{Bleomycin-Fe}^{3+} \xrightarrow[\text{Reduktase}]{\text{NADPH-Cytochrom P450}} \text{Bleomycin-Fe}^{2+}$$

Diskutiert wird dieser Mechanismus auch im Zusammenhang mit der Wirkung des Bleomycin-Fe-Komplexes an der DNS (39, 4o, 42, 78 - 8o). Daß tatsächlich der Bleomycin-Fe-Komplex für die erhöhte Lipidperoxidation verantwortlich gemacht werden kann, zeigen die Versuche, bei denen der vorher hergestellte Komplex zu den Mikrosomen zugegeben wurde (Abb. 28 und 29). Hierbei hatte auch die DNS einen hemmenden Effekt. Dieser kann dadurch erklärt werden, daß der Bleomycin-Fe-Komplex von der DNS fest gebunden wird, während er sich bei den übrigen Versuchen erst in der Mikrosomenmembran, wo die DNS nicht hingelangen kann, bildete.

In Übereinstimmung mit den in vitro-Versuchen findet man in vivo selbst bei sehr hohen Dosen von Bleomycin keine Erhöhung der Alkan-Bildung. Trotzdem entwickelte sich innerhalb von wenigen Tagen das typische Bild einer akuten Bleomycin-Intoxikation, wie z.B. Gewichtsverlust und Lungenschädigung, die histopathologisch nachweisbar war (ohne Darstellung). Die Behandlung mit Bleomycin und Fe^{2+}-Ionen ergab eine Erniedrigung der Ethan-Bildung im Vergleich zu Kontrolltieren, die nur mit Fe^{2+}-Ionen behandelt worden waren (Abb. 34 und 35). Dafür, daß dieser Befund den in vitro-Ergebnissen widerspricht, gibt es mehrere Erklärungen:

1. Möglicherweise hat sich der Bleomycin-Fe-Komplex in vivo überhaupt nicht gebildet. Dagegen spricht aber, daß eine Hemmung der Fe^{2+}-induzierten Lipidperoxidation beobachtet wurde.
2. Eventuell bildet sich der Bleomycin-Fe-Komplex in vivo nicht in der Nähe von Lipidmembranen, so daß die reaktiven Sauerstoffspezies keine Lipidperoxidation auslösen können, da sie nicht diffundieren können.
3. Der Bleomycin-Fe-Komplex könnte in vivo in Form des oxitierten (Fe^{3+}) Komplexes vorliegen, der Sauerstoff nicht aktivieren kann. Er würde nur in den Zellen wirksam werden, wo ausreichend hohe reduktive Enzymaktivitäten vorhanden sind, wie z.B. in Tumorzellen (81).

Die Ergebnisse haben andererseits gezeigt, daß eine Lipidperoxidation in vivo nach Bleomycin-Behandlung nicht abläuft. Deshalb kommt sie auch als Mechanismus der beobachteten Toxizit nicht in Frage. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß z.B. in Tumorzellen, gegen die Bleomycin ja eingesetzt wird, andere Verhältnisse vorliegen, und daß dort neben der DNS-Zerstörung eine Lipidperoxidation durch Bleomycin-Metall-Komplexe ausgelöst wird, die zur zytostatischen Wirkung beiträgt. Die Schutzfaktoren gegen eine Lipidperoxidation sind gerade in Tumorzellen schwach ausgeprägt (81).

5.4. Adriamycin als Initiator einer Lipidperoxidation

Adriamycin gehört zur Gruppe der Glycosid-Anthracyclin-Antibiotica. Es kann aus Streptomyces Peucetius isoliert werden. Die Verwendung der Anthracyclin-Antibiotika in der Tumortherapie ist relativ neu. Obwohl Adriamycin ein breites Wirkungsspektrum gegen Tumorzellen besitzt, ist sein Einsatz

beim Menschen nur begrenzt möglich, da ab einer bestimmten Dosis Nebenwirkungen auftreten, in erster Linie eine Kardiotoxizität. Die Dosen, die bei der Therapie zu einer Kardiotoxizität führen, sind kumulativ, d.h. daß nach vielen Einzeldosen derselbe Effekt auf das Herz beobachtet werden kann wie nach einer hohen Einzeldosis mit derselben Menge. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Herzen von Versuchstieren (82) und Patienten (83), bei denen eine Adriamycin-induzierte Myokardschädigung zum Tode führte, zeigten eine Schwellung der Mitochondrien, die mit einer Zerstörung der Außenmembran einherging. Von Hoffsten et al. (84) wurde in anderem Zusammenhang eine Beziehung zwischen einer Lipidperoxidation und der Schwellung von Mitochondrien nachgewiesen. Weiter wurde berichtet, daß Adriamycin in die Atmungskette eingreift, indem es Coenzym Q, die NADH-Dehydrogenase und die Succinat-Dehydrogenase hemmt (85, 86) und zu einer Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung führt (87). Handa et al. (43) zeigten, daß eine NADPH-abhängige Reduktion von Anthrachinonen, zu denen Adriamycin gehört , in Rattenlebermikrosomen unter Sauerstoff-Verbrauch abläuft. Dabei entstehen Superoxid-Radikale ($^{\cdot}O_2^-$). Andere Autoren (44, 45, 88, 89) beschrieben einen Sauerstoff- und NADPH-verbrauchenden Redox-Zyklus in einem System mit isolierter NADPH-Cytochrom P450 Reduktase bzw. mit Rattenlebermikrosomen und katalytischen Mengen von Adriamycin. Der Redox-Zyklus beginnt mit einer Reduktion des Anthracyclins durch die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase. Die Autoxidation des entstehenden Anthracyclin-Semichinons mit Sauerstoff schließt sich an (s. Abb. 68).
Das Anthracyclin-Hydrochinon reagiert wahrscheinlich nur mit $^{\cdot}O_2^-$, wobei H_2O_2 und das Anthracyclin-Semichinon entstehen (s. Abb. 68).

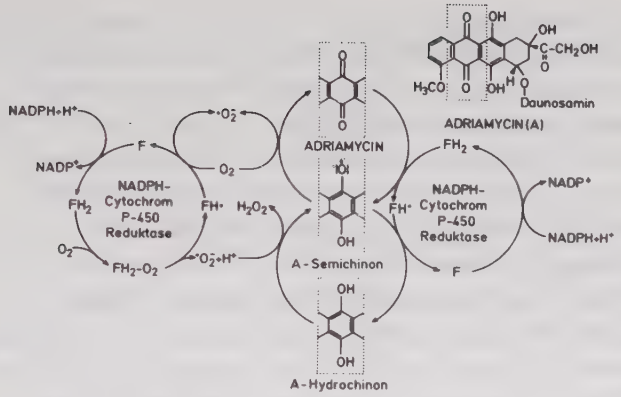


Abb. 68: Superoxid-Radikal-Bildung während des Redox-Zyklus von Adriamycin katalysiert durch NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (modifiziert nach (87)).

Dabei entsteht $\cdot O_2^-$. Der durch katalytische Mengen von Anthracyclin unterhaltene Redox-Zyklus läßt unter NADPH-Verbrauch große Mengen von Superoxid-Radikalen ($\cdot O_2^-$) entstehen. Diese könnten nach Umwandlung in andere reaktive O_2-Spezies eine Lipidperoxidation auslösen (s. 5.2.). Sie könnte die Ursache für eine Membranschädigung und damit für die kardiotoxische Wirkung von Adriamycin sein (44, 45, 9o).

Die Bestimmung der Alkane in Rattenlebermikrosomen zeigte jedoch keine Zunahme der Lipidperoxidation (Abb. 36 und 37). Eher eine Hemmung durch Adriamycin war zu sehen. Die Ergebnisse zeigen,daß die Hypothese (3, 44, 45, 8o) nicht richtig ist, daß Adriamycin alleine dadurch, daß es $\cdot O_2^-$ generiert, eine Lipidperoxidation auslösen kann.

Wie in 5.2. beschrieben, ist $^{\cdot}O_2^-$ selbst nicht in der Lage eine Lipidperoxidation auszulösen, sondern nur die Umwandlungsprodukte $^{\cdot}OH$, $^1O_2$ u.a.. Bei ihrer Entstehung spielen jedoch Eisen-Ionen eine entscheidende Rolle (38, 47, 71, 77). Unsere Untersuchungen in Rattenlebermikrosomen mit Adriamycin und Fe^{2+} zeigen, daß der Zeitpunkt der Zugabe des Adriamycins von Bedeutung ist. Wenn man Adriamycin 2 min vor dem Start der Reaktion durch Fe^{2+} und NADPH zugab (Abb. 38, 39, Tab. 2), fand man zunächst eine niedrigere Alkan-Bildung. Mit der Zeit nahm sie aber schnell zu. Nach 15 min waren wesentlich mehr Alkane entstanden, als bei der entsprechenden Fe^{2+}-Kontrolle. Diese höhere Alkan-Bildung war abhängig von NADPH und von Adriamycin (Tab. 2).

Es ist bekannt, daß Adriamycin Eisen-Ionen komplexieren kann. Ein solcher Komplex wird als Quelamycin^R (Adriamycin -xFe^{3+}) zur Zeit klinisch untersucht (91). Das Präparat ist allerdings toxischer als Adriamycin (92). Bei Versuchen mit Rattenlebermikrosomen induzierte Quelamycin nur sehr geringe Alkan-Mengen (Abb. 4o), im Vergleich zu äquivalenten Mengen von Fe^{3+} (Abb. 41). Die geringe Alkan-Bildung durch Quelamycin weist auf eine hohe Stabilität des Komplexes hin, so daß sehr wahrscheinlich nur eine geringe Menge der Eisen-Ionen aus dem Komplex freigesetzt werden dürfte.

Die Ergebnisse zeigen, daß $^{\cdot}O_2^-$ alleine eine Lipidperoxidation nicht auslösen kann, sondern daß zusätzlich Fe^{2+}-Ionen notwendig sind, die wahrscheinlich die Umwandlung von $^{\cdot}O_2^-$ in andere reaktive O_2-Spezies katalysieren (s. 5.2.). Außerdem ist es aufgrund dieser Ergebnisse unwahrscheinlich, daß ein Adriamycin-Fe-Komplex selbst direkt O_2 aktivieren kann, wie dies bei Bleomycin vermutlich der Fall ist.

Die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse ist auch deshalb erschwert, weil wahrscheinlich ein einziges Enzym verschiedene Reaktionen katalysiert. Die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase reduziert einerseits im Redox-Zyklus Adriamycin (s. Abb. 68), andererseits reduziert sie "verbrauchte" Eisen-Ionen (Fe^{3+}) wieder zu Fe^{2+} (s. Abb. 66).
In Übereinstimmung mit den in vitro-Versuchen wurde auch in vivo keine Zunahme der Ethan-Bildung nach Adriamycin-Behandlung im Vergleich zu Kontrollen beobachtet, auch nicht bei einer Dosis von 65 mg Adriamycin/kg Körpergewicht, bei der alle Ratten innerhalb von 24 Stunden starben (Abb. 46). Lediglich bei der Dosis von 45 mg Adriamycin/kg Körpergewicht wurde am 2. Tag nach der Behandlung eine geringe Ethan-Zunahme gemessen (Abb. 45), die jedoch auch als Folge und nicht als Ursache einer Intoxikation angesehen werden kann, denn diese Tiere starben ebenfalls alle nach wenigen Tagen. In vivo haben die Versuche gezeigt, daß eine Steigerung der Ethan-Abatmung der Tiere, die mit Adriamycin und Fe^{2+}-Ionen behandelt worden waren, erst ab dem 2. Tag beobachtet werden kann (Abb. 47 - 49). Gleichzeitig mit der gesteigerten Ethan-Bildung trat auch eine erhöhte Letalität der Versuchstiere auf. Die Behandlung mit Quelamycin in vivo ergab jedoch keine erhöhte Ethan-Bildung (Abb. 5o - 53). Ein Adriamycin-Fe-Komplex scheidet deshalb wahrscheinlich für die erhöhte Ethan-Bildung am 2., 3. und 4. Tag aus. Kontrollversuche, bei denen Ratten erst 24 Stunden nach der Adriamycin-Behandlung (Abb. 54, 55) Fe^{2+}-Ionen erhielten, ergaben keinen Hinweis darauf, daß eine Vorschädigung des Organismus durch Adriamycin zu einer erhöhten Lipidperoxidation am 2., 3. und 4. Tag durch dann immer noch vorhandene Eisen-Ionen geführt hatte. Dies konnte vermutet werden, da Adriamycin und Fe^{2+}-

Ionen relativ lange Halbwertzeiten im Organismus besitzen. Möglicherweise können die Ergebnisse damit erklärt werden, daß Adriamycin und Fe^{2+} erst nach Umverteilung im Organismus am 2. und den folgenden Tagen in den gleichen Zellen des Organismus vorliegen. Der aus den in vitro-Versuchen abgeleitete Mechanismus der Interaktion von $\cdot O_2^-$ mit Fe^{2+}/Fe^{3+} wäre dann auch im Ganztier gültig.
Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß der Lipidperoxidation als Ursache der Adriamycin-Kardiotoxizität eine zu hohe Bedeutung beigemessen wird, da die hohen Fe-Konzentrationen, die während dieser Versuche injiziert wurden in vivo normalerweise nie vorliegen. Möglicherweise kann die Kardiotoxizität durch Adriamycin über eine Verarmung an Sauerstoff im Herzen während des Redox-Zyklus erklärt werden. Sauerstoffmangel führt bekanntlich zu einer Myokardschädigung.

5.5. Paraquat als Initiator einer Lipidperoxidation

Es ist seit langem bekannt, daß das Herbizid Paraquat für den Menschen toxisch ist. Bei Vergiftungen, die in der Praxis bei Suizidversuchen häufig vorkommen, stehen toxische Wirkungen auf die Lunge im Vordergrund (93, 94), da sich Paraquat dort anreichert. Es treten aber auch Leberschäden auf. Bus et al. (95 - 97) postulieren aus in vitro-Versuchen, daß ein Zusammenhang zwischen einer Lipidperoxidation und der Paraquat-Toxizität bestehen könnte. Diese Frage ist bisher aber keineswegs geklärt und zahlreiche Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit diesem Problem (46, 98 - 100).

Man weiß seit langem, daß Paraquat in Gegenwart von NADPH-Cytochrom P450 Reduktase molekularen Sauerstoff zu Superoxid

($\cdot O_2^-$) reduzieren kann. Biochemisch verhält sich Paraquat ähnlich wie Adriamycin. Beide erzeugen Superoxid über einen Redox-Zyklus (s. 5.4.).

Die Ethan-Bildung als Parameter für eine Paraquat-induzierte Lipidperoxidation in vivo wurde zum ersten Mal im Rahmen dieser Untersuchungen durchgeführt, da alle bisher verfügbaren Methoden zur Messung der Lipidperoxidation sehr unzulänglich sind, wie z.B. die Messung von Malondialdehyd, der aus verschiedenen Quellen stammen kann, und der sehr schnell verstoffwechselt wird (1, 3).

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, daß bei Ratten nach Paraquat-Behandlung keine wesentliche Erhöhung der Ethan-Bildung auftritt (Abb. 56), obwohl die Toxizität relativ hoch war. Die Tiere starben nämlich alle innerhalb von einem Tag. Eine typische Paraquat-Vergiftung konnte nach Sektion der Lungen festgestellt werden (ohne Darstellung). Bei Mäusen, die bekanntlich eine große Empfindlichkeit gegenüber Paraquat zeigen (73, loo, lol), war eine gewisse Erhöhung der Ethan-Bildung nach der Paraquat-Behandlung zu beobachten, die jedoch im Vergleich zu anderen Substanzen, wie z.B. CCl_4 oder Fe^{2+}, nicht besonders ins Gewicht fiel.

Trotz erhöhter Ethan-Abatmung war die Überlebensrate der Paraquat-behandelten Mäuse größer als die Paraquat-behandelter Ratten. Aus den Ergebnissen läßt sich ebenfalls ableiten, daß die Lipidperoxidation als Mechanismus zur Erklärung der Paraquat-Toxizität nicht ausreichend ist. Außerdem ist Paraquat ein weiteres Beispiel dafür, daß eine Substanz, die einen Redox-Zyklus im Organismus durchläuft und Superoxid ($\cdot O_2^-$) entstehen läßt, nicht automatisch auch eine Lipidperoxidation auslösen muß. Vielleicht wirkt Paraquat auch einfach durch Interferenz mit der Atmungskette, da es, wie Adriamycin Reduktionsäquivalente,z.B. vom NADPH auf O_2,übertragen kann, ohne daß dabei Energie (ATP) gewonnen wird.

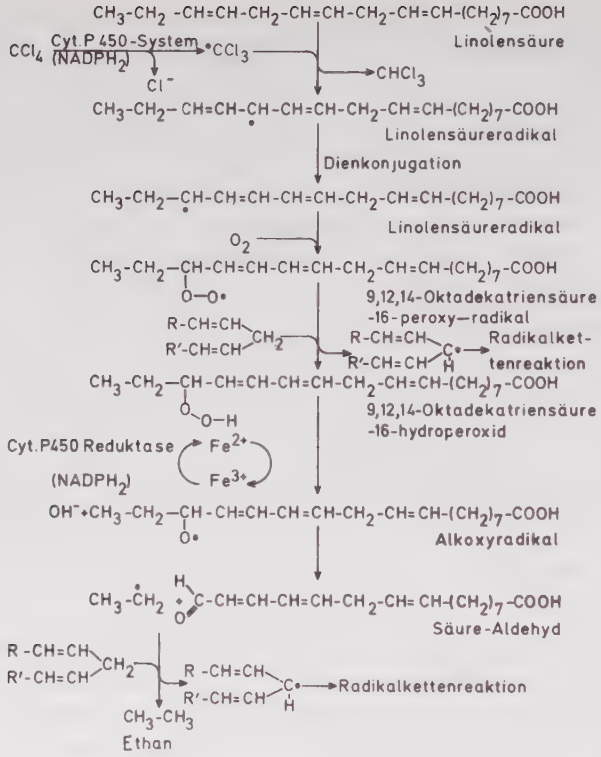


Abb. 69: Theoretischer Mechanismus der Entsthung von Ethan bei CCl_4-induzierter mikrosomaler Peroxidation von Linolensäure.
Initiation durch $^{\bullet}CCl_3$ und Propagation durch Fe^{2+}. Cyt. = Cytochrom

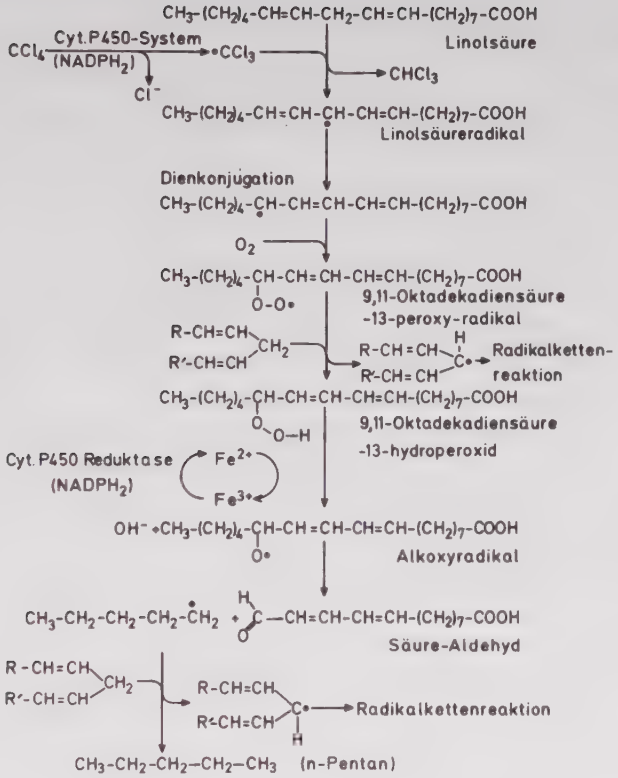


Abb. 7o: Theoretischer Mechanismus der Entstehung von n-Pentan bei CCl_4-induzierter mikrosomaler Peroxidation von Linolsäure. Initiation durch $\cdot CCl_3$ und Propagation durch Fe^{2+}.
Cyt. = Cytochrom

5.6. Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) als Initiator einer Lipidperoxidation

Die Toxizität von CCl_4 kommt höchstwahrscheinlich durch einen Metaboliten, der bei der enzymatischen Umwandlung des Moleküls im Organismus entsteht, zustande. CCl_4 ist in erster Linie hepatotoxisch. Früher als es noch als Arzneimittel eingesetzt wurde, traten beim Menschen häufig akute und chronische CCl_4-Vergiftungen auf. Heute kommen Vergiftungen praktisch nur noch am Arbeitsplatz vor.
Es wird allgemein akzeptiert, daß die Metabolisierung von CCl_4 an der mischfunktionellen Oxidase Cytochrom P450 erfolgt (12, 13).
Es wird wahrscheinlich über NADPH und die Cytochrom P450 Reduktase ein Elektron auf einen Cytochrom P450-CCl_4-Komplex übertragen, wobei Cl^- und $\cdot CCl_3$ entstehen. Vor kurzem wurde die Bildung des $\cdot CCl_3$ in Lebermikrosomen und im Ganztier mit der Spin-Abfangmethode zweifelsfrei nachgewiesen (1o3). Das CCl_3-Radikal kann mit verschiedenen Zellbestandteilen reagieren. Unter anderem wird die seit langem nachgewiesene Lipidperoxidation darauf zurückgeführt, daß das CCl_3-Radikal ein Wasserstoffatom an der Methylen-Gruppe einer ungesättigten Fettsäure abspaltet. Das dabei entstehende C-Radikal reagiert danach mit Sauerstoff (s. Abb. 69, 7o).Neben Malondialdehyd, Fettsäure-Aldehyden und Ketonen entstehen bei der Lipidperoxidation auch kurzkettige Alkane (s. 5.2.).
Alkane als Parameter für eine CCl_4-induzierte Lipidperoxidation wurden in Lebermikrosomen zum ersten Mal im Rahmen dieser Arbeit gemessen. In Übereinstimmung mit der Malondialdehyd-Methode (1, 3, 7, 8, 55) nimmt die Alkan-Bildung linear mit der Zeit zu (Abb. 58).

Außerdem ist die Alkan-Bildung streng abhängig von NADPH, was auf die Beteiligung eines metabolischen Schrittes vor Auslösung einer Lipidperoxidation hinweist. Das Verhältnis von Ethan und n-Pentan war immer 1 : 2. Dies zeigt erneut, daß in Lebermikrosomen ω3-ungesättigte Fettsäuren, wie z.B. Linolen- oder Eicosapentaensäure, aus denen Ethan stammt und ω6-ungesättigte Fettsäuren, wie z.B. Linol- und Arachidonsäure, aus denen n-Pentan stammt (23), naturlicherweise vorkommen.

Der molekulare Mechanismus der CCl_4-induzierten Lipidperoxidation ist noch völlig ungeklärt. Da bekannt ist, daß Lipidperoxide unter Metallkatalyse zerfallen, wobei erst die Vielzahl der Zerfallsprodukte entsteht, ergab sich im Rahmen dieser Untersuchungen die Frage, ob Fe-Ionen die CCl_4-induzierte Alkan-Bildung beeinflussen können.

Dies ist auch von theoretischem Interesse, da ein solcher Effekt bei der Fe^{2+}-induzierten Lipidperoxidation nur sehr schwer erfaßt werden kann, da die Fe^{2+}-Ionen, die die Lipidperoxidation auslösen, auch den Zerfall der dabei entstehenden Lipidperoxide katalysieren (s. 5.2.).

Kieczka (8) hat gezeigt, daß mehr Malondialdehyd nach CCl_4-Inkubation mit Lebermikrosomen gebildet wird, wenn Fe^{2+}-Ionen in der Trichloressigsäure vorhanden waren, in die das Inkubationsgemisch pipettiert wurde. Die Ergebnisse wurden so interpretiert, daß durch CCl_4-Metabolismus über eine Radikalkettenreaktion relativ stabile Lipidhydroperoxide bzw. Endoperoxy-hydroperoxide entstehen, die erst unter Einwirkung von Fe^{2+}-Ionen zerfallen (s. Abb. 66, 69 und 7o).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Fe^{2+}-Ionen auf Lipidhydroperoxide untersucht, die zu Alkanen zerfallen können. Dazu wurden Mikrosomen zuerst mit CCl_4 inku-

biert und dann die Reaktion mit TCA-Fe^{2+}-Lösung gestoppt, um noch vorhandene, relativ stabile Lipidhydroperoxide zu zerstören. Die Ergebnisse von Abb. 59 lassen vermuten, daß die Hydroperoxide, aus denen die Alkane entstehen, nicht sehr stabil sind; denn sonst hätte eine Zunahme der Alkane durch Fe^{2+} beobachtet werden müssen. Wenn jedoch die Fe^{2+}-Ionen direkt zur CCl_4-Inkubation (nach 3o min) zugesetzt wurden, beobachtete man eine deutlich erhöhte Alkan-Bildung (Abb. 6o), die über der Summe der CCl_4- und Fe^{2+}-Anteile lag. Die Ergebnisse sind nur so zu interpretieren, daß die Lipidhydroperoxide, aus denen Alkane entstehen, in Gegenwart von Fe^{2+} sofort zerfallen. Möglicherweise sind nur katalytische Mengen von Fe^{2+}-Ionen für diesen Reaktionsschritt notwendig. Mikrosomen-Präparationen enthalten immer geringe Mengen von freiem Eisen, das während der Inkubation zunimmt (64). Durch die CCl_4 ausgelöste Häm-Zerstörung wird möglicherweise zusätzlich Eisen aus Häm-Molekülen freigesetzt.

Es wird auch diskutiert, daß Häm-Moleküle, wie z.B. Cytochrom P45O, selbst diesen Peroxidzerfall katalysieren (35). Die anderen Lipidperoxide, aus denen Malondialdehyd entsteht, wie z.B. die Endoperoxy-Hydroperoxide (52) sind möglicherweise unter den Inkubationsbedingungen relativ stabil. Vielleicht werden die beim Fe^{2+}-katalysierten Lipidperoxidzerfall gebildeten Fe^{3+}-Ionen nicht schnell genug reduziert, so daß die Bildung der Lipidperoxide schneller als der Zerfall abläuft. Da aber im Vergleich zu Malondialdehyd nur sehr geringe Mengen von Alkanen (Malondialdehyd : Ethan = ca. loo : 1) entstehen (57), ist dieser Effekt des Eisens bei der Alkan-Bildung vielleicht nicht so ausgeprägt.

Seit einigen Jahren ist bekannt, daß Ratten nach CCl_4- Behandlung Ethan abatmen (5, 6, 9, 14, 15, 25, 27). Die Menge

der Ethan-Produktion ist dosisabhängig und hängt vom Sauerstoff-Partialdruck in der Atemluft der Tiere ab (lo4). Wenn Ratten 3o min nach Behandlung mit CCl_4 zusätzlich Fe^{2+}-Ionen injiziert wurden, potenzierte sich die Ethan-Abatmung (Abb.61). Diese Potenzierung der Ethan-Abatmung war ebenso von der Sauerstoff-Konzentration der Atemluft abhängig. Dagegen hatte der Sauerstoff-Partialdruck bei Ratten, die nur mit Fe^{2+}-Ionen behandelt worden waren, keinen Einfluß auf die abgeatmete Ethan-Menge (Abb. 17). Versuche, bei denen die Behandlung mit CCl_4 und Fe^{2+}-Ionen gleichzeitig erfolgte, ergaben dieselben Ergebnisse (Abb. 62). Die Ratten, die nur mit CCl_4 und die, die mit CCl_4 und Fe^{2+}-Ionen behandelt worden waren, produzierten sowohl Ethan, Propan als auch n-Pentan (Abb. 63). Die Ergebnisse dieser Versuche können daher nur so erklärt werden, daß die Metabolisierung von CCl_4 in vivo vom Sauerstoff-Partialdruck abhängig ist, und daß exogen zugeführte Fe^{2+}-Ionen den Zerfall der endogen gebildeten Lipidperoxide katalysieren, die während der CCl_4-Metabolisierung entstanden sind.
Eine nennenswerte Initiation der Lipidperoxidation durch diese Eisen-Ionen konnte deshalb ausgeschlossen werden.
In vivo-Versuche mit den Antioxidantien (+)-Catechin und Silybin zeigten, daß die mit CCl_4 und Fe^{2+}-induzierte Ethan-Bildung bei loo% Sauerstoff in der Atemluft der Tiere stärker hemmbar war als bei 2o% (vgl. auch Abb. 64, 65 mit Abb. 61 und 62). Dieser Befund stimmt mit neueren in vitro-Untersuchungen von Kieczka et al. 16) überein, die zeigten, daß in Lebermikrosomen Catechol-Verbindungen die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation unter geringem O_2-Partialdruck nur wenig hemmen können. Die beobachteten Hemmeffekte mit (+)-Catechin und Silybin können möglicherweise dahingehend interpretiert werden,daß Antioxidantien in erster Linie den Peroxidzerfall inhibieren, indem sie Fe^{2+}-Ionen abfangen. Dies kann jedoch aus den vor-

liegenden Ergebnissen mit nur einer Dosis nicht zweifelsfrei abgeleitet werden.

Insgesamt zeigen aber die in vivo-Versuche mit CCl_4 und Fe^{2+}, daß nicht alle gebildeten Lipidperoxide sofort zerfallen, so daß auch die Alkan-Messung nicht den gesamten Prozeß der Lipidperoxidation widerspiegelt. Dieser Befund hat auch Relevanz für die Frage der CCl_4-Toxizität. Denn metastabile Lipidhydroperoxide können ihrerseits wieder Moleküle der Zelle angreifen und neue Radikalkettenreaktionen auslösen. Dies muß nicht notwendigerweise in dem Zellkompartiment geschehen, in dem sie gebildet wurden. Möglicherweise können solche Lipidperoxide auch eine Zelle und ein Organ verlassen und andere Organe schädigen. Dies ist von besonderer Bedeutung in Organen, die eine geringe Kapazität an Schutzmechanismen gegen solche Peroxid-Reaktionen besitzen. Außerdem könnte eine Schädigung gerade dort in Erscheinung treten, wo ausreichende Mengen von freien Eisen-Ionen vorhanden sind, die den Lipidperoxid-Zerfall katalysieren.

5.7. Schlußfolgerung

Die vorliegenden Untersuchungen, die in vitro in Rattenlebermikrosomen und in vivo im Ganztier durchgeführt wurden, haben gezeigt, daß sich die Alkan-Bestimmung zur Erfassung einer Lipidperoxidation bei Beachtung besonderer Vorsichtsmaßnahmen sehr gut eignet.
Die Unterschiede zwischen in vitro- und in vivo-Untersuchungen können auf einer unterschiedlichen Verteilung der Alkane im Organismus beruhen, oder sie sind dadurch verursacht, daß verschiedene Zellkompartimente bzw. Organe, in denen die Lipidperoxidation abläuft, eine unterschiedliche Zusammensetzung ungesättigter Fettsäuren haben.

Mit einigen Substanzen, die in den Sauerstoff-Metabolismus eingreifen, konnte gezeigt werden, daß bei der Auslösung der Lipidperoxidation Eisen-Ionen von zentraler Bedeutung sind. Jedoch konnten die Effekte, die in vitro beobachtet wurden, nicht immer im Ganztier reproduziert werden, was sicher auch durch Verteilungsphänomene bedingt ist.

Beim Vergleich verschiedener molekularer Mechanismen für die Initiation einer Lipidperoxidation, bleiben aufgrund der vorliegenden Untersuchungen verschiedene Möglichkeiten offen. Die vorliegende Arbeit hat jedoch wahrscheinlich gemacht, daß $\cdot O_2^-$ selbst als auslösendes Agens nicht in Frage kommt. Die Interaktion von $\cdot O_2^-$ mit Fe^{2+} ist bei Bleomycin- und Adriamycin-induzierter Lipidperoxidation am wahrscheinlichsten, während für die Initiation der Lipidperoxidation durch Fe^{2+} alleine auch ein FeO_2^{2+}-Komplex in Frage kommt.

In allen Fällen konnte gezeigt werden, daß zumindest in Lebermikrosomen ein NADPH-abhängiges Enzym für die Alkan-Bildung notwendig ist.

Zum ersten Mal wurde hier außerdem gezeigt, daß CCl_4 eine Alkan-Bildung in Lebermikrosomen auslösen kann; Während bei der Fe^{2+}-induzierten Lipidperoxidation wahrscheinlich die Cytochrom P450 Reduktase eine Schlüsselfunktion ausübt, spielt bei der CCl_4-induzierten Lipidperoxidation das Cytochrom P450 die entscheidende Rolle.

Aus den Ergebnissen der Versuche mit CCl_4 kann weiter abgeleitet werden, daß Fe^{2+}-Ionen auch einen wichtigen Beitrag zum Zerfall der Lipidhydroperoxide leisten. Dieser Effekt konnte ebenso wie die O_2-Abhängigkeit auch in vivo demonstriert werden.

Der Einfluß der Eisen-Ionen auf den Lipidperoxidzerfall ist von besonderer Bedeutung für die Frage eines Zusammenhangs zwischen Toxizität und Lipidperoxidation, denn es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß nicht nur die Zerstörung von

Lipidmembranen und die Lipidperoxide selbst zur Toxizität beitragen, sondern daß andere Zerfallsprodukte viel toxischer sind (7, 16 - 18).
Damit dürfte den Eisen-Ionen im Körper eine zentrale Bedeutung zukommen. Sie würden bestimmen, ob die durch andere Substanzen, wie z.B. CCl_4, induzierten Lipidperoxide toxische Wirkungen haben oder nicht. Daneben dürften Enzyme, wie z.B. Superoxid-Dismutase und Katalase, die Fe^{2+}-induzierte Lipidperoxidation verhindern können, und die Glutathion-Peroxidase, die Lipidhydroperoxide inaktiviert, zum Schutz vor einer Lipidperoxidation wirksam sein. Außerdem können Antioxidantien, wie z.B. Vitamin E, das entweder mit O_2-Radikalen oder mit Lipidperoxiden interferiert (19), die Toxizität verhindern.
Daß die in vitro beobachteten Effekte in vivo oft nicht auftraten, liegt möglicherweise gerade an solchen effizienten Schutzmechanismen, die in den einzelnen Zellen in unterschiedlicher Aktivität vorhanden sind. Daß die toxischen Wirkungen in vivo oft nicht mit der Lipidperoxidation korrelierten, hat sicher seinen Grund darin, daß auch andere Reaktionen ablaufen, die ein physiologisches Gleichgewicht stören können. Die Lipidperoxidation bleibt jedoch ein Mechanismus von vielen, der für toxische Wirkungen vom Fremdstoffen in Frage kommt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Bildung kleiner Mengen der Alkane Ethan,Propan und n-Pentan, die aus mehrfach-ungesättigten Fettsäure-Hydroperoxiden entstehen können, wurde in vitro in Rattenlebermikrosomen und in vivo in Ratten und z.T. auch in Mäusen gemessen. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgte gaschromatographisch. Die mikrosomalen Inkubationen wurden in einem neu entwickelten Inkubationssystem durchgeführt. Für die Versuche zur Messung der Alkane in der Ausatemluft der Tiere wurden bekannte Methoden eingesetzt, die optimiert wurden.
   Es zeigte sich, daß Ethan sowohl in vitro als auch in vivo ein wesentlich besserer Parameter der Lipidperoxidation ist als n-Pentan, und daß Propan nur in äußerst geringen Mengen entsteht. Kleine Mengen von Ethan werden auch von unbehandelten Kontrolltieren abgeatmet, was auf eine endogene Lipidperoxidation hinweist.

2. $FeCl_2$ induzierte konzentrationsabhängig und in Abhängigkeit von NADPH Ethan, Propan und n-Pentan in Lebermikrosomen. Demnach sind wie für die Malondialdehyd-Bildung auch für die Fe^{2+}-induzierte Alkan-Bildung NADPH-abhängige Enzyme notwendig.
   In vivo bildeten Ratten nach Behandlung mit $FeCl_2$ dosisabhängig Ethan, sehr wenige Propan, aber überhaupt kein n-Pentan. Bei 2o% und loo% Sauerstoff in der Atemluft der Tiere wurden dieselben Alkan-Mengen gebildet. Radikalfänger mit Catecholstruktur konnten die Fe^{2+}-induzierte Ethan-Bildung in vivo in gewissem Umfang hemmen.

3. Das Zytostatikum Bleomycin führte in Lebermikrosomen in Gegenwart von Eisen-Ionen und Sauerstoff in Abhängigkeit von NADPH zu einer stärkeren Lipidperoxidation als Eisen-

Ionen alleine, gemessen als Ethan-, Propan- und n-Pentan-Bildung. Dies zeigt, daß ein Bleomycin-Eisen-Komplex nur dann Sauerstoff aktivieren kann, wenn das Eisen im Komplex immer wieder in den reduzierten Zustand übergeführt wird. DNS, die in Gegenwart von Bleomycin, Fe^{2+} und O_2 Strangbrüche erfährt, hemmte die mikrosomale Alkan-Bildung nur dann, wenn bereits vorher ein DNS-Bleomycin-Fe-Komplex vorlag.
In vivo führte weder die Behandlung von Ratten mit Bleomycin noch die mit Bleomycin und $FeCl_2$ zu einem Anstieg der Alkan-Bildung, auch wenn toxische Dosen Verwendung fanden. Dies stellt die Übertragbarkeit der in vitro-Ergebnisse auf die Situation in vivo in Frage.

4. Adriamycin (Doxorubicin), ein Zytostatikum, das in Lebermikrosomen und anderen in vitro-Systemen einen Redox-Zyklus durchläuft, wobei große Mengen von Superoxid-Radikal ($\cdot O_2^-$) entstehen, konnte eine mikrosomale Lipidperoxidation ebenfalls nur dann auslösen, wenn zusätzlich Eisen-Ionen vorhanden waren. Auch bei dieser Ethan-, Propan- und n-Pentan-Bildung waren NADPH-abhängige Enzyme beteiligt.
Ratten, die mit Adriamycin, u.a. toxischen Dosen, behandelt worden waren, atmeten keine zusätzlichen Alkan-Mengen ab. Eine wesentliche Erhöhung der Ethan-Abatmung wurde auch nach Behandlung von Mäusen und Ratten mit dem Herbizid Paraquat nicht gefunden, obwohl Paraquat ebenfalls $\cdot O_2^-$ generieren kann. Wenn jedoch eine Behandlung mit Adriamycin und $FeCl_2$ erfolgte, konnte eine starke, mehrere Tage anhaltende Lipidperoxidation in vivo mit Hilfe der Ethanbestimmung beobachtet werden.

5. Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) induzierte in Lebermikrosomen in Abhängigkeit von NADPH eine Alkan-Bildung, wobei das Verhältnis Ethan : Propan : n-Pentan $\approx$ 1 : 0,05 : 2,5 betrug.

Eisen-Ionen verstärken die Alkan-Bildung beträchtlich, wobei weit mehr Alkane entstanden als aus Versuchen mit getrennter Inkubation der Einzelkomponenten erwartet werden konnte. Erklärt wird dies damit, daß Eisen-Ionen den Zerfall der durch CCl_4-Wirkung ausgelösten Lipidhydroperoxide katalysieren.
In vivo atmeten Ratten, die mit CCl_4 behandelt wurden, Ethan, Propan und n-Pentan in großen Mengen im Verhältnis von ca. 1 : o,3 : 1 ab. Die Alkan-Bildung in vivo war unter 2o% Sauerstoff etwa dreimal so hoch wie unter loo%, was durch Hemmung des reduktiven Schritts durch O_2 bei der metabolischen Aktivierung von CCl_4 am Cytochrom P45O erklärt werden kann. Tiere, die mit CCl_4 und $FeCl_2$ behandelt wurden, atmeten erheblich mehr Alkane ab als aufgrund getrennter Applikation der Einzelkomponenten zu erwarten wäre.
Der inhibitorische Effekt des Sauerstoffs trat hierbei wie bei Behandlung mit CCl_4 auf. Auch Radikalfänger mit Catecholstruktur inhibierten. Damit kann wahrscheinlich gemacht werden, daß Eisen-Ionen auch in vivo den Zerfall von Lipidhydroperoxiden katalysieren.

6. Diskutiert wird die Rolle der Eisen-Ionen bei der Initiation der Lipidperoxidation durch Bildung eines Eisen-Sauerstoff-Komplexes oder durch Reaktion mit Superoxid-Radikalen, wobei weitere reaktive Sauerstoffspezies entstehen. Außerdem wird die Rolle des Eisens bei der sogenannten Propagation der Lipidperoxidation herausgestellt, durch die viele verschiedene Reaktionsprodukte entstehen und neue Radikalkettenreaktionen ausgelöst werden. Für beide Schritte sind Enzyme wichtig, die die Lipidperoxidation durch Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} aufrechterhalten. Die Frage, ob die Lipidperoxidation für toxische Wirkungen von Fremdstoffen in vivo verantwortlich sei kann, wird ebenfalls besprochen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. G.L. Plaa and H. Witschi:
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 16, 125 (1976)

2. W.A. Pryor:
"Free Radicals in Biology" Vol. 1 - 4, Academic Press, New York (1976 - 1980)

3. J.S. Bus and J.E. Gibson:
In: Reviews in Biochemical Toxicology Vol. 1, (E. Hodgson, J.R. Bend and R.M. Philpot, Eds.), Elsevier, New York, pp. 125 (1979)

4. B. Schobert and E.F. Elstner:
Plant. Physiol. 66, 215 (1980)

5. U. Köster, D. Albrecht and H. Kappus:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 41, 639 (1977)

6. C. A. Riely, G. Cohen and M. Lieberman:
Science 183, 208 (1974)

7. R.M. Schulze: Dissertation, Düsseldorf (1981)

8. H. Kieczka: Dissertation, Tübingen (1979)

9. D.G. Hafeman and W.G. Hoekstra:
J. Nutr. 107, 656 (1977)

10. A.L. Tappel:
In: Free Radicals in Biology Vol. 4, (W.A. Pryor, Ed.), Acedemic Press, New York, pp. 1 (1980)

11. J.F. Mead:
In: Free Radicals in Biology Vol 1, (W.A. Pryor, Ed.), Academic Press, New York, pp.51 (1976)

12. R.O. Recknagel, E.A. Glende and A.M. Hruszkewycz:
In: Free Radicals in Biology Vol. 3, (W.A. Pryor, Ed.),
Academic Press, New York, pp. 97 (1977)

13. T.F. Slater:
Biochemical Mechanisms of Liver Injury, Academic Press,
London (1978)

14. M. Sagai and A.L. Tappel:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 49, 283 (1979)

15. T.D. Lindstrom and M.W. Anders:
Biochem. Pharmacol. 27, 563 (1978)

16. M.K. Roders, E.A. Glende, and R.O. Recknagel:
Biochem. Pharmacol. 27, 437 (1978)

17. R.M. Schulze and H. Kappus:
Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 27, 129 (198o)

18. A. Benedetti, M. Comporti and H. Esterbauer:
Biochim. Biophys. Acta 62o, 281 (198o)

19. L.A. Wittig:
In: Free Radicals in Biology Vol. 4, (W.A. Pryor, Ed.),
Academic Press, New York, pp. 295 (198o)

2O. M. Lieberman and L.W. Mapson:
Nature (London) 2o4, 343 (1964)

21. M. Lieberman and P. Hochstein:
Science 152, 213 (1966)

22. C.D. Evans, G.R. List, A. Dolev, D.G. McConnell and
R.L. Hoffmann: Lipids 2, 432 (1967)

23. E.E. Dumelin and A.L. Tappel:
Lipids 12, 894 (1977)

24. D.H. Donovan and D.B. Menzel:
Experientia 34, 775 (1978)

25. U. Köster, D. Albrecht and H. Kappus:
In: Industrial and Environmental Xenobiotics - In Vitro Versus in Vivo Biotransformation and Toxicity, (J.R. Fouts and I. Gut, Eds.), Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 235 (1978)

26. C.J. Dillard, E.E. Dumelin and A.L. Tappel:
Lipids 12, 1o9 (1977)

27. D.G. Hafeman and W.G. Hoekstra:
J. Nutr. 1o7, 666 (1977)

28. H. Frank, T. Hintze, D. Bimboes and H. Remmer:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 56, 337 (198o)

29. H. Kieczka and H. Kappus:
Toxicol. Lett. 5, 191 (198o)

30. A. Wendel, S. Feuerstein, K.H. Konz:
Biochem. Pharmacol. 28, 2o51 (1979)

31. P. Hochstein and L. Ernster:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 388 (1963)

32. P. Hochstein, K. Nordenbrand and L. Ernster:
Biochem. Biophys. Res.Commun. 14, 323 (1964)

33. T.C. Pederson and S.D. Aust:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 789 (1972)

34. T.C. Pederson, J.A. Buege and S.D. Aust:
J. Biol. Chem. 248, 7134 (1973)

35. B.A. Svingen, J.A. Buege, F.O. O'Neal and S.D.Aust:
J. Biol. Chem. 254, 5892 (1979)

36. T.C. Pederson and S.D. Aust:
Biochim. Biophys. Acta 385, 232 (1975)

37. T.C. Pederson and S.D. Aust:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 1o71 (1973)

38. Ciba Foundation Symposium 65 (New Series),
Oxygen Free Radicals and Tissue Damage,
Excerpta Medica, Amsterdam (1979)

39. S. M. Hecht:
Bleomycin - Chemical, Biochemical and Biological
Aspects, Springer-Verlag, New York (1979)

4O. R.M. Burger, J. Peisach and S.B. Horwitz:
Life Sci. 28, 715 (1981)

41. Y. Sugiura and T. Kikuchi:
J. Antibiot. 31, 131o (1978)

42. L.W. Oberley and G.R. Buettner:
FEBS Lett. 97, 47 (1979)

43. K. Handa and S. Sato:
GANN 66, 43 (1975)

44. J. Goodman and P. Hochstein:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 797 (1977)

45. R.C. Donehower, C.E. Meyers and B.A. Chabner:
Life Sci. 25, 1 (1979)

46. E.M. Kosower:
In: Free Radicals in Biology Vol. 2, (W.A. Pryor, Ed.),
Academic Press, New York, pp. 1 (1976)

47. B. Halliwell:
FEBS Lett. 92, 321 (1978)

48. H. Remmer, H. Greim, J.B. Schenkman and R.W. Estabrook:
Methods in Enzymology Vol.lo, 7o3 (1967)

49. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

50. F. Bernheim, M.L. Bernheim amd K.M. Wilbur: J. Biol. Chem. 174, 257 (1948)

51. R.O. Sinnhuber, T.C. Yo and T.C. Yo: J. Food Res. 23, 626 (1958)

52. W.A. Pryor, J.P. Stanley and E. Blair: Lipids 11, 37o (1976)

53. Y.A. Buege and S.D. Aust: Methods in Enzymology Vol. 52 (Part C), 3o2 (1978)

54. E.A. Smuckler, E. Arrhenius and E. Hultin: Biochem. J. 1o3, 55 (1967)

55. H. Kappus, H. Kieczka, M.E. Scheulen and H. Remmer: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 3oo, 179 (1977)

56. H.M. Bolt, H. Kappus, A. Buchter and W. Bolt: Arch. Toxicol. 35, 153 (1976)

57. H. Muliawan: Diplomarbeit, Tübingen (1978)

58. R.J. Horvat, W.G. Lane, H.Ng and A.D. Shepherd: Nature (London) 2o3, 523 (1964)

59. G.J. Garssen, J.F.G. Vliegenthart and J. Boldingh: Biochem. J. 122, 327 (1971)

60. G.J. Garssen, J.F.G. Vliegenthart and J. Boldingh: Biochem. J. 13o, 435 (1972)

61. A. Bindoli, L. Cavallini and N. Siliprandi: Biochem. Pharmacol. 26, 24o5 (1977)

62. W.Wilmanns: Bleomycin - Experimentelle Grundlagen und erste klinische Ergebnisse, 1. Deutsches Bleomycin-Symposium, München 1973, Stuttgart (1975)

63. E.D.Wills:
Biochem. J. 113, 315 (1969)

64. E.D. Wills:
Biochem. J. 113, 325 (1969)

65. D.J. Kornbrust and R.D. Mavis:
Mol. Pharmacol. 17, 4oo (198o) a

66. I. Fridovich:
In: Free Radicals in Biology Vol.1, (W.A. Pryor, Ed.),
Academic Press, New York, pp. 239 (1976)

67. J.B. Schenkman, I. Jansson, G. Powis and H. Kappus:
Mol. Pharmacol. 15, 428 (1979)

68. C. Auclair, D. DeProst and J. Hakim:
Biochem. Pharmacol. 27, 355 (1978)

69. J.M. McCord and I. Fridovich:
J. Biol. Chem. 244, 6o49 (1969)

7O. C. Richter, T. Pripfl and K. Winterhalter:
FEBS Lett. 111, 95 (198o)

71. F. Haber and J. Weiss:
J. Proc. Roy. Soc. (Ser. A) 147, 332 (1934)

72. H.J. Fenton:
J. Chem. Soc. (London) 65, 899 (1894)

73. D.J. Kornbrust and R.D. Mavis:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 53, 323 (198o) b

74. S.D. Aust, D.L. Roerig and T.C. Pederson:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 1133 (1972)

75. A. Bertelli:
New Trends in the Therapy of Liver Diseases,
Karger, Basel (1975)

76. H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi and Y. Okami:
J. Antibiot. 19 A, 2oo (1966)

77. J.M. McCord and I. Fridovich:
Ann. Intern. Med. 89, 122 (1978)

78. J.M.C. Gutteridge:
FEBS Lett. 1o5, 278 (1979)

79. J.M.C. Gutteridge and X.C. Fu:
FEBS Lett. 123, 71 (1981)

8O. R.M. Burger, A.R. Berkowitz, J. Peisach and S.B. Horwitz: J. Biol. Chem. 255, 11832 (198o)

81. K.A. Kennedy, B.A. Teicher, S. Rockwell and A.C. Sartorelli: Biochem. Pharmacol. 29, 1 (198o)

82. E. Arena, M. Arico, F. Biondo, N. D'Alessandro, L. Dusonchet, N. Gebbia, F. Gerbasi, R. Sanguedolche and L. Rausa:
In: Adriamycin Rev. AORTC Int. Symp., Brüssel 1974, (M. Staquet et al., Eds.), European Press-Medicon, Ghent, pp. 16o (1975)

83. E.A. Lefrak, J. Pitha, S. Rosenheim and J.A. Gottlieb:
Cancer 32, 3o2 (1973)

84. P.E. Hoffsten, F.E. Hunter, J.M. Gebicki and J. Weinstein: Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 276 (1962)

85. M. Gosalvez, M. Blanco, J. Hunter, M. Mico and B. Chance: Europ. J. Cancer 1O, 567 (1974)

86. Y. Iwamoto, I.L. Hansen, T.H. Porter and K.Folkers:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 633 (1974)

87. K. Meiler and D.H. Petering:
Biochem. Pharmacol. 25, 2o85 (1976)

88. N.R. Bachur, S.L. Gordon and M.V. Gee:
Mol. Pharmacol. 13, 9o1 (1977)

89. N.R. Bachur, S.L. Gordon and M.V. Gee:
Proc. Nat. Acad. Sci. US. 76, 954 (1979)

9O. C.E. Myers, W.P. McGuire, R.H. Liss, I. Ifrim,
K. Grotzinger and R.C. Young: Science 197, 165 (1977)

91. M. Gosalvez, M.F. Blanco, C. Vivero and
F. Vallés: Europ. J. Cancer 14, 1185 (1978)

92. A. Brugarolas, J.A.P. Llanderal, M.T.G. Miralles,
A.J. Lacave, M.G. Marco, J.M. Iuqzierdo, A.C.R. Llorian,
and A.J. Ribas: Cancer Treat. Rep. 63, 9o9 (1979)

93. J.D. Malone, M. Carmody and B. Keogh:
J. Irish Med. Assoc. 64, 59 (1971)

94. P. Smith and D. Heath:
Crit. Rev. Toxicol. 4, 411 (1976)

95. J.S. Bus, S.D. Aust and J.E. Gibson:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 749 (1974)

96. J.S. Bus, S.D. Aust and J.E. Gibson:
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 11, 31 (1975)

97. J.S. Bus, S.Z. Cagen, M. Olgaard and J.E. Gibson:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 35, 5o1 (1976)

98. M.A. Trush, E.G. Mimnaugh, E. Ginsburg and T.E. Gram:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 6o, 279 (1981)

99. C. Steffen and K.J. Netter:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 47, 593 (1979)

loo. H. Shu, R.E. Talcott, S.A. Rice and E.T. Wei:
Biochem. Pharmacol. 28, 327 (1979)

lol. R.E. Talcott, H. Shu, and E.T. Wei:
Biochem. Pharmacol. 28, 665 (1979)

lo2. M.R. Montgomery:
Toxicol. Appl. Pharmacol. 36, 543 (1976)

lo3. J.L. Poyer, P.B. McCay, E.K. Lai, E.G. Janzen and E.R. Davies:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 94, 1154 (198o)

lo4. H. Kieczka, H. Remmer and H. Kappus:
Biochem. Pharmacol. 3o, 319 (1981)

Meine akademischen Lehrer waren:

Physik:

Dr. M. Brendle, Dr. F. Gönnenwein und
Prof. Dr. H. Krüger

Mathematik:

Dr. A. Pracht

Anorganische Chemie:

Prof. Dr. S. Kemmler-Sack, Dr. D. Krug, Priv.-Doz.
Dr. U. Kunze, Prof. Dr. E. Lindner, Priv.-Doz.
Dr. I.-P. Lorenz, Dr. G. Pausenwang, Prof. Dr.
Ing. W. Rüdorff, Prof. Dr. J. Strähle

Organische Chemie:

Prof. Dr. E. Mayer, Prof. Dr. H. Hagenmaier,
Prof. Dr. M. Hanack, Prof. Dr. G. Häfelinger,
Prof. Dr. E. Müller, Dr. H. Pauschmann, Prof.
Dr. A. Rieker, Prof. Dr. W. Rundel, Prof. Dr.
H. Suhr, Prof. Dr. H. Stegmann, Priv.-Doz. Dr.
H. Straub, Prof. Dr. G. Wulff

Physikalische Chemie:

Dr. W. Braun, Dr. G. Gauglitz, Dr. H. Haas,
Dr. V. Hoffmann, Dr. H. Karfunkel, Prof. Dr. H.
Mauser, Prof. Dr. H. Oberhammer, Prof. Dr. D.
Oelkrug, Prof. Dr. W. Zeil

Biochemie:

Prof. Dr. G. Jung, Prof. Dr. H. Weiss, Prof.
Dr. W. Voelter

Pharmakologie und Toxikologie:

Prof. Dr. Dr. H.M. Bolt, Priv.-Doz. Dr. H. Kappus,
Prof. Dr. H. Remmer

LEBENSLAUF

Am 16. März 1951 wurde ich, Hassan Muliawan, als viertes Kind der Eheleute Mansoer Muliawan und Erna Muliawan in Djakarta, Indonesien, geboren.
Von 1957 bis 1969 besuchte ich die Volksschule, die Mittelschule und die Oberschule in Djakarta, Indonesien, wo ich im November 1969 die Abschlußprüfung (Abitur) ablegte.

Von April 197o bis März 1971 besuchte ich das Studienkolleg der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
Von Sommer-Semester 1971 bis Sommer-Semester 1978 studierte ich Chemie an der Eberhard Karls-Universität Tübingen. Im Juli 1974 legte ich die Diplomvorprüfung und im Dezember 1977 den mündlichen Zeil der Diplomhauptprüfung in Chemie ab. Danach fertigte ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Herbert Remmer am Institut für Toxikologie der Eberhard Karls-Universität Tübingen die Diplomarbeit an mit dem Thema "Zerfall der Lipide von Lebermikrosomen zu Ethan, Propan Pentan und Malondialdehyd bei der Peroxidation durch Eisen-Ionen". Am 25. Oktober 1978 wurde mir die Bezeichnung Diplom-Chemiker zuerkannt.
Im November 1978 begann ich am Medizinischen Institut für Umwelthygiene an der Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Hermann Kappus mit den Experimenten zu der vorliegenden Arbeit.
Seit Winter-Semester 78/79 bin ich im Fach Chemie an der Universität Düsseldorf immatrikuliert.